Olga Zavate Nicolae Cajal

ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE

IMPLICAȚII ÎN PATOLOGIE ȘI ÎN POLUAREA MEDIULUI AMBIANT

EDITURA ACADEMIEI
REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

Scanned with OKEN Scanner

OLGA ZAVATE NICOLAE CAJAL

ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE

Implicaţii în patologie şi în poluarea mediului ambiant

EDITURA ACADEMIEI
REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, 1983

Scanned with OKEN Scanner

NON-POLIOMYELITIC VIRUSES

Implications in pathology
and in environment pollution

НЕПОЛИОМИЭЛИТНЫЕ ВИРУСЫ

Последствия в патологии
и в загрязнении окружающей среды

EDITURA ACADEMIEI
REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

R—79717, Bucureşti,
Calea Victoriei 125

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

PREFAȚĂ 7

1. ISTORIC. CLASIFICARE. GENERALITĂȚI 9
1.1. Istoric 9
1.2. Clasificare 9

2. PROPRIETĂȚILE VIRUSURILOR NEPOLIOMIELITICE 13
2.1. Morfologie. Structură. Dimensiuni 13
2.2. Compoziție chimică 14
2.3. Susceptibilitatea la agenți fizici și chimici 15
2.3.1. Agenții fizici 15
2.3.2. Agenții chimici 15
2.3.3. Substanțele antivirale. Interferonul 16
2.4 Gazde receptive 17
2.4.1. Culturi celulare 18
2.4.2. Animale de laborator 21
2.5. Multiplicarea 23
2.6. Proprietăți antigenice. Imunitate. Interferență 25
2.6.1. Proprietăți antigenice 25
2.6.2. Imunitate. Interferență 26
Bibliografie 28

3. EPIDEMIOLOGIA, PATOGENIA ȘI CLINICA INFECȚIILOR DETERMINATE DE ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE 35
3.1. Epidemiologie 35
3.1.1. Răspîndirea infecției 35
3.1.2. Procesul epidemiologic 36
3.1.3. Profilaxie și combatere 44
3.2. Patogenie 45
3.3. Manifestări clinice 46
3.3.1. Boli neurologice 46
3.3.2. Boli ale mușchilor 53
3.3.3. Cardiopatii 54
3.3.4. Boli eruptive 57
3.3.5. Boli respiratorii 60
3.3.6. Boli oculare 62
3.3.7. Boli ale aparatului digestiv 63
3.3.8. Boli fetale și la nou-născuți 65
3.3.9. Boli renale 67
3.3.10. Alte boli 68
Bibliografie 68

Scanned with OKEN Scanner

4. DIAGNOSTIC DE LABORATOR 79

4.1. Prelevarea, transportul și prelucrarea produselor patologice 79
4.2. Metode convenționale de diagnostic etiologic 81
4.2.1. Examene virusologice 81
4.2.2. Diagnostic serologic 87
4.3. Metode rapide de diagnostic etiologic 89
4.3.1. Microscopia electronică 90
4.3.2. Imunofluorescența 90
4.3.3. Tehnici ELISA 91
4.3.4. Radioimunotestarea 92
4.3.5. Reacții de precipitare în gel 92
4.4. Măsuri de prevenire a infecțiilor de laborator 92
Bibliografie 93

5. ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE ÎN MEDIUL AMBIANT . . . 99

5.1. Enterovirusuri nepoliomielitice în apă 100
5.1.1. Îmbolnăviri hidrice determinate de enterovirusuri nepoliomielitice . . 101
5.1.2. Metode de evidențiere 102
5.1.3. Prezența în diferite categorii de apă 115
5.1.4. Studii experimentale privind supraviețuirea enterovirusurilor nepoliomielitice în apă 123
5.1.5. Îndepărtarea enterovirusurilor din apă 125
5.1.5.1. Procedee fizice 126
5.1.5.2. Dezinfecția 129
Bibliografie 134
5.2. Enterovirusuri nepoliomielitice în sol 142
5.2.1. Transmiterea prin sol 142
5.2.2. Prezența enterovirusurilor în sol 143
5.2.3. Metode de evidențiere a enterovirusurilor în sol 144
5.2.4. Studii experimentale privind supraviețuirea enterovirusurilor în sol . . . 145
5.2.5. Enterovirusuri în reziduuri solide 149
Bibliografie 152
5.3. Enterovirusuri nepoliomielitice în alimente 153
5.3.1. Îmbolnăviri de origine alimentară 154
5.3.2. Prezența enterovirusurilor în diferite alimente 155
5.3.3. Metode de evidențiere a enterovirusurilor în diferite alimente 156
5.3.4. Studii experimentale privind supraviețuirea enterovirusurilor în alimente 159
5.3.5. Posibilități de inactivare a enterovirusurilor în alimente 162
5.3.6. Programe de cercetare, norme, standarde de virologie alimentară . . . 169
Bibliografie 170
5.4. Enterovirusurile în aer 172
5.4.1. Căile posibile de transmitere aeriană 172
5.4.2. Prezența enterovirusurilor în aer 175
5.4.3. Metode de evidențiere a enterovirusurilor în aer 177
5.4.4. Inactivarea enterovirusurilor 179
Bibliografie 181
5.5. Enterovirusurile nepoliomielitice pe diferite suprafețe 182
5.5.1. Prezența enterovirusurilor pe suprafețe și metodele de evidențiere a acestora 182
5.5.2. Studii privind durata de supraviețuire a enterovirusurilor pe suprafețe și pe diferite obiecte și posibilități de inactivare 185
Bibliografie 187
SUMMARY 189

Scanned with OKEN Scanner

. 79
. 79
. 81
. 81
. 87
. 89
. 90
. 90
. 91
. 92
. 92
. 92
. 93
NT . . . 99
. 100
litice . . 101
. 102
. 115
epoliomie-
. 123
. 125
. 126
. 129
. 134
. 142
. 142
. 143
. 144
sol . . . 145
156
mente 159
. 162
ră . . . 169
. 170
. 172
. 172
. 175
. 177
. 179
. 181
. 182
acestora 182
rafeţe şi
. 185
. 187
. 189

PREFAŢĂ

Este o datorie a noastră de a explica cititorilor de ce am considerat necesară publicarea unei monografii consacrate enterovirusurilor nepoliomielitice şi de ce am dat o extindere atît de mare capitolelor privind comportarea acestor virusuri în mediul ambiant.

Importanţa pentru sănătatea publică în general a enterovirusurilor, gen de virusuri cu localizare primară în intestin, este astăzi bine cunoscută.

Şi dacă o mare perioadă de timp atenţia a fost reţinută de virusul poliomielitei cu cele trei tipuri antigenice ale sale, progresele obţinute în cercetările dirijate expres către aprofundarea cunoştinţelor privind acest virus au condus neaşteptat la descoperirea unor virusuri, iniţial confundate sau, mai corect, izolate din afecţiuni diagnosticate drept poliomielită. Aceste noi enterovirusuri au polarizat atenţia virusologilor, epidemiologilor şi infecţioniştilor. Este vorba de descoperirea treptată a virusurilor Coxsackie şi ulterior a virusurilor ECHO şi a unor virusuri apropiate, reunite ulterior în grupuri bine conturate: grupul virusurilor Coxsackie şi grupul virusurilor ECHO, aparţinînd genului Enterovirus *din marea familie* Picornaviridae.

Dezvoltarea rapidă a cunoştinţelor privind aceste noi grupuri şi acumularea de date cu privire la implicaţiile lor în patologia generală au antrenat un număr din ce în ce mai mare de cercetători din diferitele domenii ale medicinii şi biologiei. Alături de poliovirusuri, enterovirusurile nepoliomielitice au constituit totodată obiectul unor modele experimentale variate şi ingenioase, care au adus lămuriri constituind elemente de progres chiar în domeniul biologiei generale.

Rezolvarea atît de spectaculoasă a profilaxiei poliomielitei prin folosirea vaccinului descoperit de Jonas Salk şi mai ales a celui cu virusuri vii, modificate, al lui Albert Sabin, care au făcut ca poliomielita, această problemă de sănătate publică de dimensiuni mondiale, să fie considerată o problemă a „trecutului", a determinat concentrarea atenţiei asupra celorlalte enterovirusuri, enterovirusurile nepoliomielitice. Astfel, cercetătorii, medici şi biologi, sesizînd just perspectivele sprijinirii apărării sănătăţii publice prin combaterea acestor enterovirusuri cu un atît de mare polimorfism clinic şi cu o pondere ridicată pe toate meridianele globului, şi-au canalizat în ultimii ani interesul către studierea cît mai amănunţită a acestora.

Scanned with OKEN Scanner

Asociat la eforturile generale, aportul şcolii româneşti de virusologie, al epidemiologilor, infecţioniştilor şi igieniştilor români a contribuit la cunoaşterea biologiei acestor virusuri, a relaţiilor cu diferite gazde, a incidenţei pe teritoriul nostru, a comportamentului lor în mediul ambiant.

În cadrul studiului acestui ultim aspect s-a impus noţiunea de „poluare virală" cu referire specială la poluarea apei, solului, alimentelor şi aerului prin enterovirusuri nepoliomielitice, desprinzîndu-se pregnant accentul ce trebuie pus pe inactivarea lor, fără de care nu poate fi concepută combaterea.

Considerînd că datele acumulate privind cuceririle în acest domeniu „cald" de mare actualitate vor putea fi utile, mai ales ca punct de plecare pentru noi observaţii şi cercetări în această direcţie, ne-am încumetat a redacta monografia de faţă.

Cu speranţa că lucrarea va fi bine primită de cititori, exprimăm mulţumiri sincere Editurii Academiei R. S. România pentru concretizarea excepţională a eforturilor noastre.

AUTORII

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 1

ISTORIC. CLASIFICARE. GENERALITĂŢI

1.1. ISTORIC

Enterovirusurile nepoliomielitice au fost descoperite în jurul anului 1950, cu ocazia investigaţiilor efectuate în focare de polimielită. Astfel, *virusul Coxsackie* a fost pentru prima dată descris de către Dalldorf şi Sickles în localitatea Coxsackie, statul New York, unde un agent viral a putut fi izolat de la două cazuri presupuse poliomielitice numai prin inocularea produselor patologice la şoareci nou-născuţi. În anii următori, agenţi virali similari au fost izolaţi de la pacienţi cu meningită aseptică, boli febrile, mialgie epidemică, gripă estivală, herpangină, encefalomiocardita nou-născuţilor. Melnick şi colab. au avut meritul de a fi reunit aceste observaţii, de a fi studiat caracterele tulpinilor virale izolate şi de a le fi reunit în *grupul Coxsackie.*

Virusurile ECHO au fost izolate cînd posibilitatea cultivării virusurilor în culturi de celule a devenit o realitate. După această descoperire, în cadrul cercetărilor pe scară largă în domeniul poliomielitelor a fost izolat şi un număr de agenţi virali care nu erau însă neutralizaţi de serurile antipoliomielitice şi nici nu determinau manifestări patologice la şoareci nou-născuţi. Întrucît aceşti agenţi virali au fost izolaţi adesea de la copii aparent sănătoşi, un timp îndelungat aceste virusuri au fost considerate ca lipsite de putere patogenă, de unde denumirea de virusuri ECHO (*Enteric Cytopathogenic Human Orphan*), adică fără o patologie umană aparentă. Ulterior, însă, virusurile ECHO au încetat de a mai fi considerate „orfane" de boală, numeroase sindroame clinice fiind, rînd pe rînd, asociate cu acest gen de enterovirusuri: meningite aseptice, infecţii respiratorii, febre cu exantem etc.

ECHO-virusurile sînt limitate la om. Dar virusuri apropiate au fost întîlnite şi la alte specii animale: EC*M*O (M=*monkeys*) la maimuţe, EC*S*O (S=*swine*) la porcine, EC*B*O (B=*bovine*) la bovine etc. Menţionăm că în ţara noastră, relativ curînd după descoperirea enterovirusurilor nepoliomielitice pe plan mondial au apărut tratate şi lucrări în domeniul respectiv (Nicolau şi colab., 1962; Cajal şi colab., 1959a; Ionescu-Mihăieşti şi colab., 1954, Duca şi colab., 1956).

1.2. CLASIFICARE

Enterovirusurile fac parte din familia Picornavirdae una din cele mai importante familii de virusuri patogene pentru om, denumirea de *pico*

Scanned with OKEN Scanner

(= mici) reflectînd o parte din caracterele lor. Alte caracteristici ale virusurilor din această familie sînt prezentate în tabelul 1.1. Familia este divizată în două mari genuri : Enterovirus (identificare primară în tractul intestinal) şi Rhinovirus (identificare primară în nas); după unii autori acestei familii îi aparţin şi calicivirusurile (Duca, 1979).

Tabelul 1.1

Caracteristicile familiei Picornaviridae şi a genului Enterovirus

Caracteristici[a]	Familia Picornaviridae	Genul Enterovirus
Tipul de acid nucleic	ARN	ARN
Structura şi proprietăţile acidului nucleic	monospiralar cu 1 piesă, greutate moleculară 2,6 daltoni	ARN, genom cu polaritate pozitivă, 2,6 daltoni
Dimensiune	20—30 nm diametru	20—30 nm diametru
Tip de simetrie a capsidei	icosahedric	icosahedric
Număr capsomere	32	60
Comportament la agenţi fizici şi chimici	rezistenţă la eter; stabilitate cationică faţă de inactivarea termică	— rezistenţă la eter şi detergenţi; — stabilitate la pH3 — stabilitate cationică faţă de inactivarea termică; — inhibarea multiplicării prin HBB[b]
Gazdă	om şi animale	om şi animale
Leziuni specifice anatomopatologice	diferite	— leziuni neurale la primate şi rozătoare, leziuni musculare, degenerescenţă de ţesut grăsos brun şi de pancreas la rozătoare. Uneori nepatogen

[a] Propuse pentru clasificarea virusurilor de către Comitetul internaţional de taxonomie a virusurilor, 1976
[b] α2-hidroxibenzilbenzimidazol
[c] Excepţie fac Coxsackie A9 şi ECHO 22, 23 şi 28.

Caracterele genului Enterovirus sînt prezentate în acelaşi tabel; pe baza proprietăţilor menţionate, un virus nou-izolat poate fi încadrat în genul respectiv (Newman şi colab., 1973). Detalii asupra proprietăţilor enterovirusurilor nepoliomielitice vor fi prezentate în capitolul 2. În ceea ce priveşte patogenitatea, unele tipuri antigenice produc leziuni neurale la primate şi rozătoare, altele leziuni musculare în ţesutul gras cafeniu şi pancreas la rozătoare, iar altele nu s-au dovedit patogene pentru animale de laborator. Pe culturi celulare, umane şi de primate, exceptînd virusurile Coxsackie-grup A, cele mai multe enterovirusuri sînt citopatogene. Unele tulpini posedă hemaglutinine pecifice, altele nu. Toate conţin antigene specifice fixatoare de complement.

Problema clasificării şi mai ales a sistematizării enterovirusurilor se află într-o permanentă mişcare, pe de o parte datorită reaşezării tulpinilor în cadrul tipurilor şi subtipurilor cunoscute şi, pe de altă parte, a

descoperirii de noi tipuri antigenice ce necesită a fi încadrate în acest gen de virusuri (Richter și colab., 1971; Cooper și colab., 1978; Nakao și colab., 1981).

În prezent, se admite că enterovirusurile sînt subîmpărțite în subgenurile:

— poliovirus (cu 3 tipuri);
— Coxsackie A (cu 24 tipuri);
— Coxsackie B, (cu 6 tipuri);
— ECHO (cu 30 tipuri) și
— virusuri „nespecificate" (cu 4 tipuri).

Tabelul 1.2

Lista provizorie a enterovirusurilor umane (Gaudin 1964)

Enterovirus nr.	Vechea denumire	Numele tulpinii prototip	Enterovirus nr.	Vechea denumire	Numele tulpinii prototip
1	Polio-virus tip 1	Brunhild			
2	Polio-virus tip 2	Lansing			
3	Polio-virus tip 3	Leon			
4	Coxsackie A1	Tompkins	33	ECHO 1, 8	Farouk
5	— A2	Fleetwood	34	— 2	Cornelis
6	— A3	Olson	35	— 3	Morrisey
7	— A4	High Point	36	— 4	Pesascek
8	— A5	Swartz	37	— 5	Noyce
9	— A6	Gdula	38	— 6,6,	D'Amori, Di Meo
10	— A7	Parker			Burgess
11	— A8	Donovan	39	— 7	Wallace
12	— A9	Bozek	40	— 9(Cox. A 23)	Hill
13	— A10	Kowalik			
14	— A11	Belgique-1	41	— 11	Gregory
15	— A12	Texas-12	42	— 12	Travis
16	— A13(18)	Flores	43	— 13	Hamphill
17	— A14	G—14	44	— 14	Tow
18	— A15	G—9	45	— 15	CH—96—51
19	— A16	G—10	46	— 16	Harrington
20	— A17	G—12	47	— 17	CHHE—29
21	— A18	G—13	48	— 18	Metcalf
22	— A19	NIH—8663	49	— 19	Burke
23	— A20,20A, 20B	IH—35	50	— 20	JV—1
24	— A21	Kuykendall (Coe virus)	51	— 21	Farina
			52	— 22	Harris
25	— A22	Chulman	53	— 23	Williamson
26	— A24 (ECHO 34)	Joseph	54	— 24	De Camp
			55	— 25	JV—4
			56	— 26	Coronel
27	Coxsackie B1	Connecticut-5	57	— 27	Bacon
28	— B2	Ohio-1	59	— 29	JV—10
29	— B3	Nancy	60	— 30	Bastianni
30	— B4	J.V.B.	61	— 31	Caldwell
31	— B5	Faulkner	62	— 32	PR—10
32	— B6	Schmitt	63	— 33	—
—			68	Nespecificate	—
			69	„	—
			70	„	—
			71	„	—

Scanned with OKEN Scanner

Aceste enterovirusuri „noi" nu au fost încadrate în subgenurile menţionate ci, conform convenţiilor Comitetului internaţional de taxonomie a virusurilor, li s-a acordat un simplu număr începînd cu 68 pînă la 71.

Se apreciază că divizarea enterovirusurilor în subgenurile Coxsackie şi ECHO este oarecum arbitrară şi că taxonomia acestora necesită a fi revizuită fiind neconvingătoare. Sistemul numerotării propus în anii anteriori de Comitetul de enterovirusuri şi care lasă posibilitatea încadrării pe parcurs a noilor subtipuri decelate nu este unanim admis, păstrîndu-se încă în uz curent vechea denumire.

Date recente aduc argumente suficiente pentru încadrarea virusului hepatitei A în genul Enterovirus. Amintim că încă din 1962, Constantinescu şi colab. au sugerat o astfel de încadrare.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 2

PROPRIETĂŢILE VIRUSURILOR NEPOLIOMIELITICE

Studiul morfologiei, structurii şi compoziţiei chimice a enterovirusurilor presupune obţinerea de particule virale cu un înalt grad de concentrare şi purificare, prin debarasare de constituenţii celulelor sau ţesuturilor în care acestea s-au multiplicat. De menţionat că proprietăţile enterovirusurilor au fost stabilite pe tulpinile prototip, cele recent izolate avînd adesea caracteristici diferite (Rosenwirth şi Eggers, 1980; Mertens şi colab., 1980).

2.1. MORFOLOGIE. STRUCTURĂ. DIMENSIUNI

Determinarea dimensiunilor şi morfologiei virusurilor se realizează în mod obişnuit prin ultrafiltrare, ultracentrifugare şi microscopie electronică. Prin numeroase studii de acest fel (Dunker, 1974; Hasegawa şi Induye, 1978; Rueckert, 1978; Akers şi Burlingham, 1979) s-a stabilit că enterovirusurile au un diametru de 25—30 nm. Virionul are un nucleotid (ARN) şi o capsidă cu simetrie cubică; studiile prin difracţie cu raze X indică 60 de unităţi structurale. ARN-ul viral se prezintă ca un singur lanţ continuu, cu o greutate moleculară de 2,5 milioane daltoni.

Structura enterovirusurilor formează încă obiectul unor controverse. După Rueckert (1978), particula virală este lipsită de înveliş, este uşor sferoidală, cu profil neted pe micrografiile electronice, cu un diametru hidratat de aproximativ 30 nm şi cu o masă de aproximativ 8,6 milioane daltoni. Conţine un singur lanţ de ARN (GM 2,5—2,8 milioane) cu poli-(A) la al treilea capăt şi o mică proteină UPg (GM 6000) legată de celălalt capăt; este transformată în ARNm, fără pierderea infectivităţii dar cu pierderea VPg din reziduul fosfat la nucleotidul terminal 5.

Se consideră că autoasamblarea virionilor are loc prin aranjarea componentelor structurale după o matriţă determinată de proprietăţile de legare a proteinelor între ele şi a acestora cu acidul nucleic viral. Din modul de aranjare al unităţilor structurale chimice (lanţ polipeptidic, agregat de lanţuri identice sau diferite) rezultă structuri vizibile la microscopul electronic (capsomerele care se grupează constituind capsida).

În ceea ce priveşte *virusurile Coxsackie*, plecînd de la material provenind de la şoareci nou-născuţi, s-a reuşit să se obţină, în special în pancreas, cristale dodecaedrice cu 4 feţe hexagonale, cu dimensiuni maxime de 100 milimicroni (Burch şi Harb., 1975). Prin recristalizare se obţin cristale mai mici, plate, pătrate sau dreptunghiulare (fig. 2.1), cu o virulenţă pentru şoareci între 10^{11} — 10^{12} DL_{50}/ml. *In vitro*, în citoplasma celulelor HeLa infectate cu virus Coxsackie, au fost observate cu ajutorul microscopului

Scanned with OKEN Scanner

electronic cristale compuse din particule de virus. La rîndul lor, Harb și Burch (1975) au constatat la microscopul electronic în pancreasul de șoarece nou-născut inoculat cu virus Coxsackie B_4 două feluri de particule virale: unele împachetate sub forma unei rețele de cristale caracteristice, altele sub forma unor mase sferice cu diametru de 100 nm; acestea din urmă sînt formate din două straturi concentrice de 6—10 particule, probabil stadii ale ciclului replicativ ale virusului în trecerea spre forma tipică.

Virusurile ECHO evidențiază la rîndul lor, după inocularea în culturi de celule, formațiuni alungite, cu dispoziție cristalină, dar fără înveliș, cu dimensiuni de 14/2 nm — probabil forma incompletă a virusului. Virionii au un diametru de 22—24 nm și sînt formați dintr-o masă centrală densă, intens osmiofilă, cu un diametru de 13—15 nm, înconjurată de o membrană externă slab definită. Particulele sînt dispuse hexagonal, cîte 6 în jurul unui filament presupus a fi o tramă directrice. S-au observat și forme incomplete, lipsite de masa centrală (acestea niciodată în afara celulei).

În 1978, Kawanishi a arătat că celulele FL infectate cu ECHO6, incubate la 25°C și examinate la microscopul electronic, prezintă în citoplasmă incluzii cristaline formate din particule virale mature iar în zona centrală a nucleului cristale compuse din particule viriforme imature (fig. 2.2—2.4).

Enterovirusul 71, cultivat pe culturi de celule, a determinat în citoplasma acestora apariția de cristale tipice așezate hexagonal, vizibile la microscopul electronic (Tsuruhara și colab., 1981).

Pentru o serie de enterovirusuri, s-au descris prin studii în gradient de densitate cu clorură de cesiu două tipuri de virioni, cu densitate de 1,34 g/cm³ și respectiv de 1,44 g/cm³. Nu s-au găsit deosebiri în proprietățile genomilor sau în compoziția polipeptidică, dar infecțiozitatea componentelor „ușoare" a fost de 4 ori superioară față de cea a componentelor „grele" (Rowlands și colab., 1975; Rueckert, 1978).

2.2. COMPOZIȚIE CHIMICĂ

Dificultățile principale ale studiului compoziției chimice a virusurilor constau în general în debarasarea acestora de constituenții celulelor în care s-au multiplicat. Cu toate acestea, există numeroase rezultate care au condus la stabilirea compoziției chimice a enterovirusurilor, structură simplă: acid nucleic (26%) și proteină (74%). Proporția bazelor în acidul nucleic al picornavirusurilor este de 29% adenină, 25% uracil, 24% guanidină și 22% citozină. Numărul aproximativ de gene =14. Proteinele sînt reprezentate de 4 polipeptide (VP1, VP2, VP3 și VP4).

Fiecare constituent al particulei virale reprezintă, ca și la alte virusuri, suportul material al anumitor proprietăți. Astfel, acidul nucleic constituie suportul infectivității; introdus în celulele gazdei receptive determină sinteza virală. Este fragil la factori externi. Învelișul proteic are ca rol protejarea substanței genetice, mijlocește adsorbția virusului pe receptori, participă în primele stadii ale pătrunderii virusului în celula-gazdă și conferă specificitatea imunologică. După Beatrice și colab. (1980), în cazul virusurilor Coxsackie polipeptidul VP2, proteina de suprafață a virionilor este cea care induce sinteza anticorpilor neutralizanți la iepure. Polipeptidele încălzite la 40°C, 45°C și 55°C își păstrează antigenici-

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 2.1. — Cristale de virus Coxsackie prezente în miofibrile. Imagine obținută la microscopul electronic (după Gyorkey și colab., 1978)

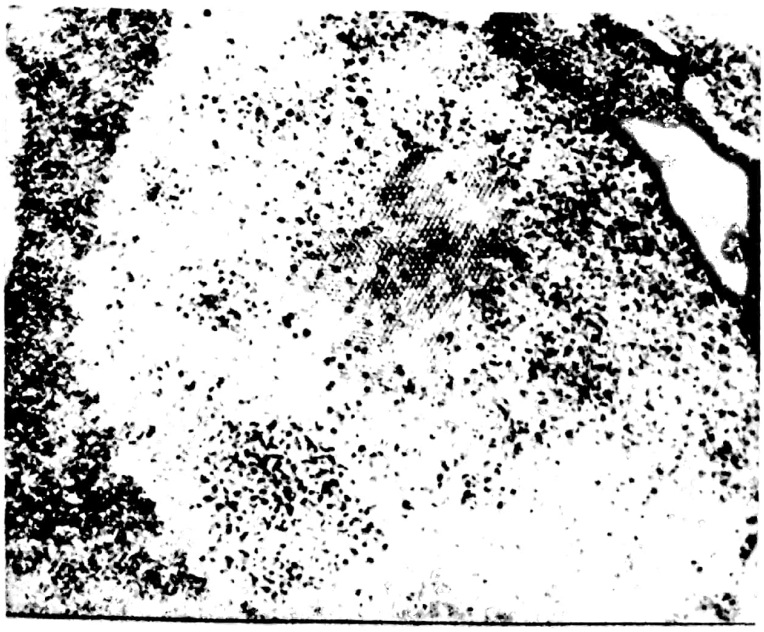


Fig. 2.2. — Cristale de virus ECHO prezente în culturi celulare FL. Majoritatea particulelor de cristal sînt lipsite de nucleu. De notat nucleolii care sînt prezenți în aceeași arie cu cristalele. Imagine obținută la microscopul electronic (după Kawanishi, 1978)

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 2.3. — Cristale intranucleare de virus ECHO prezente în culturi celulare FL. Numeroase formaţiuni determinate de membrană ocupă regiunea centrală a celulei. Nucleul are formă neregulată. Săgeata indică un cristal intranuclear tipic. Microfotografie electronică (după Kawanishi, 1978)

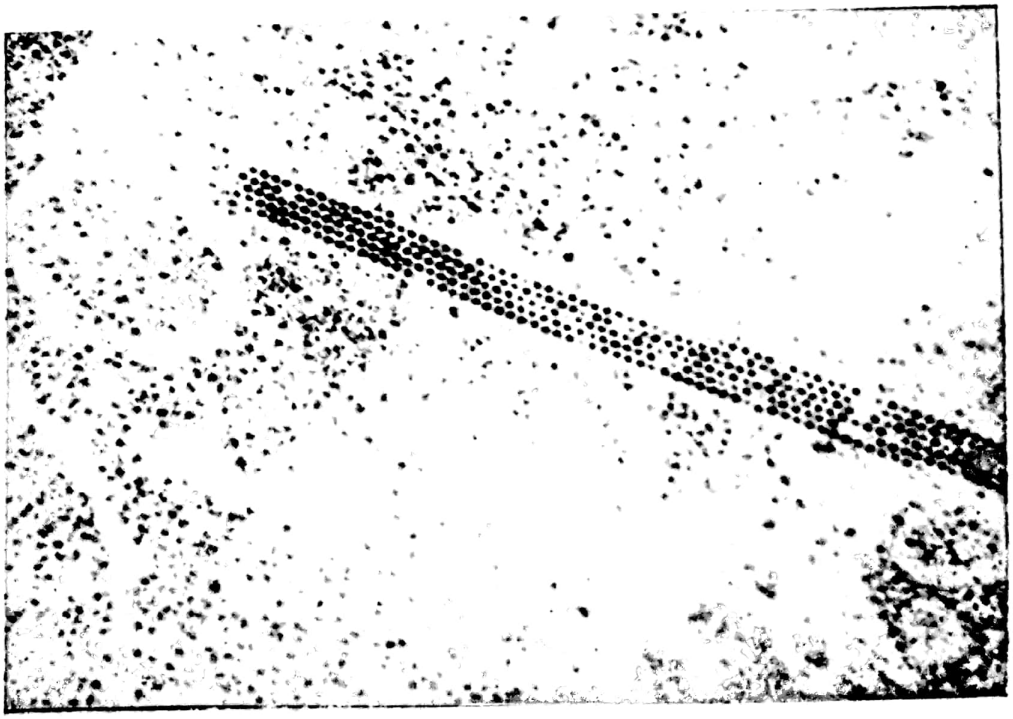


Fig. 2.4. — Cristale intracitoplasmatice de virus ECHO în culturi celulare FL. Imagine obţinută la microscopul electronic (după Kawanishi, 1978)

Scanned with OKEN Scanner

tatea fiind propuse a fi utilizate pentru prepararea unor vaccinuri (Hasegawa şi Induye, 1978).

Capacitatea unor enterovirusuri de a aglutina eritrocitele umane este explicată prin prezenţa proteinelor pe nucleocapsida cu stuctură caracteristică specifică, precum şi prin orientaţia sterică, ambele complementare grupelor corespunzătoare hematiilor umane din grupul 0. Spre deosebire de alte virusuri, chimotripsina determină inhibarea hemaglutinării enterovirusurilor prin distrugerea enzimatică a receptorilor şi nu prin inhibarea lor (Aderca, 1962). Capacitatea hemaglutinantă a fost observată iniţial pentru tipurile 3, 6, 7, 11 şi 12 de virusuri ECHO, la care s-au adăugat serotipurile 13, 19 şi 21; pentru serotipul 6 şi altele s-au dovedit diferenţe intratipice. Virusurile ECHO tip 4, 5, 15 şi 16 au prezentat, la rîndul lor, o hemaglutinare slabă şi inconstantă.

Spre deosebire de alte virusuri, calitatea hemaglutinantă a enterovirusurilor nu poate fi separată de infectivitate. Este alterată de variaţii de pH, fenomenul fiind subordonat forţelor electrostatice şi poate fi modificat de substratul celular pe care a fost cultivat virusul (Matsuda şi colab., 1974).

2.3. SUSCEPTIBILITATEA LA AGENŢI FIZICI ŞI CHIMICI

Enterovirusurile au, în general, o stabilitate remarcabilă faţă de majoritatea agenţilor fizici şi chimici, în comparaţie cu alte virusuri.

2.3.1. AGENŢII FIZICI

La temperatura camerei, enterovirusurile rezistă săptămîni şi chiar luni. Nu se inactivează la temperaturi moderate de inactivare (56°C), în special dacă sînt incluse în lichide protectoare (de ex. laptele). La 60°C sînt distruse în 20 minute. Termorezistenţa enterovirusurilor este crescută prin adăugare de ioni (magneziu, calciu şi sodiu), de cistină sau de substanţe sulfhidrilreducătoare (Halsted şi colab., 1970; Gevaudan şi colab., 1971).

La temperaturi joase (sub — 35°C), enterovirusurile pot rezista mulţi ani (mijloc de conservare a tulpinilor virale). După unii autori (Berge şi colab., 1971), liofilizarea poate conserva o parte din titrul şi patogenitatea tulpinilor, în timp ce alţii (Portocală şi colab., 1969) arată că poliovirusul, luat ca indicator, îşi reduce puternic infectivitatea, cu modificări ireversibile ale corpusculului viral, în special ale învelişului proteic.

Inactivarea prin ultraviolete, radiaţii electromagnetice (gama) şi radiaţii ionizante a fost constatată pentru virusurile Coxsackie şi poliovirusuri (Jarvis şi Sena, 1980; Sullivan şi colab., 1973; Ward, 1980). La rîndul lor, ultrasunetele inactivează virusurile prin dezagregare mecanică.

2.3.2. AGENŢII CHIMICI

Una dintre caracteristicile familiei picornavirusurilor constă în rezistenţa la pH3, spre deosebire de majoritatea celorlalte virusuri (stabile în limitele de pH 5,0—9,0).

Glicerina (50%) poate conserva enterovirusurile în fragmente de organe timp de luni şi chiar ani de zile la 4°C. Datorită lipsei de lipide

Scanned with OKEN Scanner

esenţiale, enterovirusurile sînt insensibile la acţiunea eterului şi detergenţilor; sînt rezistente, de asemenea, la acţiunea dezoxicolatului de sodiu, a enzimelor proteolitice şi a bilei.

Din punct de vedere al rezistenţei faţă de dezinfectante, enterovirusurile, făcînd parte din grupul virusurilor hidrofile, au o rezistenţă mai mare la aceşti agenţi chimici (Kuwert şi Thraenhart, 1977). Inactivarea reală a virusurilor are loc în cazul modificării ireversibile a acidului nucleic. Acţiunea asupra învelişului proteic poate scădea infectivitatea, fiind însă posibilă, datorită conservării substanţei genetice, reactivarea virusului.

Dintre dezinfectante, compuşii disociaţi ai oxigenului (ozon, apă oxigenată, permanganat de potasiu, hipoclorit) şi derivaţii iodului au acţiune intens virulicidă prin deteriorarea ARN (Roy şi colab., 1981). Formolul este şi el un agent inactivant, acţiunea sa manifestîndu-se însă asupra proteinelor virale. Clorul şi compuşii săi, fenolii şi crezolii sînt mai puţin activi, în timp ce amestecul de fenol şi ioni de Cu^{2+} s-a dovedit mai eficient (Tenno şi colab., 1980; O'Brien şi Newman, 1979; Alvarez şi O'Brien, 1982; Dubes şi Moslin, 1980). S-a mai descris acţiunea inactivantă a glutaraldehidei (Saitanu şi Lund, 1975), a trinatriufosfatcloruratului, a unor detergenţi (Bondarenko şi Grigorieva, 1977; Sirobokov şi colab., 1975), a oxidului de etilen (Jordy şi colab., 1975). Drulak şi colab. (1978 a, b) au studiat eficienţa comparativă a unor dezinfectante pentru inactivarea virusului Coxsackie B5 şi ECHO 11, etanolul şi Wescodinul fiind cele mai virulicide; Kurtz (1979) a studiat efectul mai multor substanţe din grupul alcoolilor asupra virusului ECHO 11, cel mai eficient fiind etanolul 95%.

Romanescu şi colab. (1965), studiind acţiunea unor subsanţe chimice asupra virusului Coxsackie A9, au constatat că formalina (1 : 2 000) şi cloramina B (1,5—2,5%) neutralizează virusul, în timp ce acidul benzoic, acidul salicilic ş.a. nu îl influenţează.

Pentru stabilirea acţiunii dezinfectantelor este necesar a se ţine seama de condiţiile de temperatură, pH, prezenţa de substanţe organice etc. Testarea se poate face în suspensie, dar este de preferat pe suport (Kuwert şi Thraenhart, 1977). Dezinfecţia pentru enterovirusuri se aplică pentru apa potabilă, bazine de înot, suprafeţe şi mîini.

2.3.3. SUBSTANŢELE ANTIVIRALE. INTERFERONUL

S-a demonstrat experimental că infecţia virală poate fi prevenită sau oprită, la nivel celular sau al organismului, cu ajutorul unor substanţe chimice active, fie prin inhibarea unor procese de sinteză a componentelor virale, fie prin inhibarea adsorbţiei, pătrunderii, decapsidării ori eliberării virusului infectant din celule.

Dintre substanţele recunoscute a avea o acţiune antivirală asupra enterovirusurilor, menţionăm derivaţii de guanidină (G) şi 2-(a-hidroxibenzil)-benzimidazolul (HBB). Se admite că aceste substanţe inhibă specific replicarea *in vitro*, pe culturi celulare, a unor picornavirusuri prin acţiunea faţă de ARN (după ce a fost sintetizat dar nu eliberat din complexul de replicare), blocînd astfel sintetiza de ARN viral şi proteine capsidale. G şi HBB au mecanisme de acţiune similare dar nu identice deoarece, deşi uneori sinergice, s-au găsit unele tipuri antigenice de enterovirusuri inhibate numai de către una din aceste substanţe. *In vivo* (la animal), G şi HBB sînt lipsite de efect protector datorită, probabil, uşurinţei cu care apar şi se dezvoltă mutante drog-rezistente şi chiar drog-dependente ca

Scanned with OKEN Scanner

urmare a unei concentraţii nesatisfăcătoare realizate în organele-ţintă (Eggers, 1978; Duca, 1979).

Aşa cum reiese din tabelul 2.1, pe lîngă aceste substanţe, în ultimii 10 ani au mai fost studiate şi altele cu acţiune antivirală (Tonew şi Tonew, 1980; Timofeeva şi colab., 1977; Galabov şi colab., 1972; Sinderov şi colab., 1971; Fediciko, 1974, 1975).

Tabelul 2.1

Substanţe sau grupuri de substanţe cu acţiune faţă de enterovirusuri

Derivaţi de guanidină
D-2 (-hidroxibenzilbenzimidazol-HCl (D—HBB)
Derivaţi ai adamantanului
Rodanina (2-tio-4-oxotiazol)
Derivaţi ai tiofenului
Hidrazide ale acidului cinconimic
Aminooxicetone heterociclice (selectiv pentru ECHO) (3-oxi-piperidonă)
Derivaţi de tiouree (N-fenyl-N' aril sau alkiltiouree; N—2 hidrofenoltiouree)
2,4-dinitrofenol
Derivaţi ai acidului monoiodacetic (monoiodacetat)
Săruri ale acidului malonic
H-(6- (2-clor-4 metoxifenoxi)-hexil] 3,5-heptandion

Acţiunea inhibantă a unui *interferon exogen* a fost demonstrată asupra infecţiei şoarecelui alb nou-născut cu virus Coxsackie B3. Interferonul a avut efect profilactic dacă a fost administrat cu 12—48 ore după inoculare, prevenind astfel evoluţia miocarditei (Norris şi Loh, 1973).

2.4. GAZDE RECEPTIVE

Enterovirusurile pot fi cultivate numai în organismul unor animale de laborator şi în culturi celulare. Deoarece animalele de laborator prezintă o serie de dezavantaje legate de sensibilitatea diferită de la o specie la

Tabelul 2.2

Gazdele de laborator receptive pentru diferitele grupe de enterovirusuri

Gazda receptivă	Polio-virus	Virus Coxsackie		Virus ECHO	Tipuri antigenice noi
		A	B		
Cultură celulară (ECP)	+	θ[a]	+	+[b]	+
Şoarece sugar (paralizie)	θ	+	+	θ[c]	+

Excepţii: [a] ++ Coxsackie A9; ± Coxsackie A7, 11, 13, 15 şi 18
[b] θ ECHO tip 21, 4, 22 şi 23
[c] ++ ECHO 9

Scanned with OKEN Scanner

alta, prezența de virusuri proprii (așa cum s-a semnalat în literatura de specialitate pentru șoarecele de laborator și maimuță) și costul ridicat (Rai și Mallick, 1975), culturile celulare rămîn gazdele de laborator de elecție pentru izolarea majorității enterovirusurilor.

În tabelul 2.2. este redată susceptibilitatea celor două principale gazde de laborator pentru diferite grupe de enterovirusuri.

2.4.1. CULTURI CELULARE

Pentru cultivarea enterovirusurilor pot fi utilizate culturi celulare primare, celule diploide sau linii celulare.

Susceptibilitatea diferitelor sisteme de culturi celulare față de izolarea primară a enterovirusurilor și ciclul de multiplicare a acestora a constituit o preocupare a numeroși cercetători din țară (Aderca și colab., 1963; Aderca și Iftimovici, 1971; Cajal și colab., 1972) și din străinătate (McSwiggan și George, 1970; Harford și colab., 1970; Medrano și Green, 1973; Schmidt și colab., 1978; Zeipel, 1980).

În tabelul 2.3 este redată sensibilitatea principalelor culturi celulare față de enterovirusuri, cu menționarea excepțiilor în cadrul fiecărui grup. Reiese că o parte dintre enterovirusurile nepoliomielitice au capacitatea de a fi cultivate pe culturi celulare primare, în special pe cele de rinichi de maimuță sau amnios uman. Se admite că, pentru izolarea primară a enterovirusurilor, sînt de preferat celulele de origine umană. Multe dintre ECHO virusuri se cultivă mai bine în linii diploide umane; cîteva virusuri Coxsackie A se cultivă numai în astfel de linii celulare (Hatch și Marchett, 1971; Zeipel, 1980).

S-au scos în evidență diferențe de susceptibilitate ale culturilor de rinichi de maimuță, în raport cu specia de origine (Macacus rhesus, cynomolgus, Erythrocebus patas, Cercopithecus mona, nictitans, cephus, aethiops etc.). Liniile celulare de rinichi de maimuță de tip L23, BS—C—1, VERO și altele au dat rezultate similare cu cele obținute pe culturi primare (Dahling și colab., 1974; Mustafina, 1981).

Au mai fost încercate culturi celulare beta din pancreas murin pentru selecționarea tulpinilor diabetogene de virus Coxsackie B (Reagan și Crowell, 1979) și linii hibride umane și murine (Medrano și colab., 1973); au mai fost folosite celule de embrion de cobai (Landry și colab., 1980), țesut de glandă tiroidă (Kaprelian și colab., 1980), celule endoteliale miocardice și miocite de șoarece pentru variantele cardiotrope de virus Coxsackie B3 (Hague și colab., 1980), precum și linia de rabdomiosarcom uman (Bell și Kosgrown, 1980).

În condiții de laborator, o serie de tulpini de virus Coxsackie A au putut fi adaptate la culturi celulare tratate cu cortizon (Voiculescu și colab., 1969); tulpinile își pierd patogenitatea față de animal dar își păstrează proprietățile imunogene.

Studiind factorii care determină receptivitatea sau rezistența unor linii celulare față de enterovirusuri, Gulevici și colab. (1980) au demonstrat pe două linii I—96, una receptivă și alta rezistentă, că filtratul de celule rezistente nu a transmis acest caracter celulelor sensibile; dimpotrivă, filtratul de celule receptive a dus la restabilirea receptivității celulelor rezistente. Sensibilitatea sau rezistența culturilor celulare I—96 față de virusurile Coxsackie B sînt asociate după Hesin și colab. (1978) cu cromozomul G21.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2.3

Sensibilitatea unor culturi celulare faţă de enterovirusuri

Culturi celulare	Denumire	Ţesut de origine	Specie	Aspect morfologic	Virus Polio	Virus Coxsackie A	Virus Coxsackie B	Virus ECHO
Primare	MK	rinichi	maimuţele *M.rhesus* şi *M.cynomolgus*	epitelial	++	0[a]	+	++[c]
	HEK	rinichi	embrion uman	,,	++	0[d]	++	++
	GMK-AH 1	rinichi	maimuţa verde	,,	++			
	RM	rinichi	maimuţa *Cercopithecus*	,,	++	0[a]	+	++[c]
	RE(?)	rinichi	iepure	,,	+	0	0	0
		rinichi	hamster	,,	0	0	±	0
	EG(?)	embrion total	găină	conjunctiv	+	0	0	0
Diploide	WI–38	pulmonar	embrion uman	fibroblastic	++	0[b]		++
Stabilizate	HeLa	col uterin	embrion uman	epitelial	+	0	0	±
	RD	rabdomiosarcom	embrion uman	epitelial	+	0	0	+
	VERO	rinichi	maimuţa *Cercopithecus aethiops*	epitelial	++	0	0	+
	BGM	rinichi	maimuţa ,,	epitelial	++	0	+	+
	HEp-2	carcinom laringe	embrion uman	epitelial	+	0	0	±
	KB	carcinom bucal	embrion uman	epitelial	+	0	0	±
Hibride	BSC-1	rinichi	maimuţa *Cercopithecus aethiops*	epitelial	++	0	+	++
	BHK_{21}	rinichi	hamster	epitelial	0	0	±	0

Excepţii:

a) ++ Coxsackie A 9 şi 21–24
b) ++ Coxsackie A 9
c) 0 ECHO 21
d) după adaptări

Scanned with OKEN Scanner

Righthand şi Bagshaw (1978) au arătat la rîndul lor că replicarea unor enterovirusuri (ECHO tip 6) pe culturi celulare este stimulată de una sau două proteine izolate din celulele neinfectate permisive; acestea pot transforma celulele semipermisive în celule integral permisive. Producerea virusului creşte de 10—100 de ori după adăugarea acestei proteine care a fost caracterizată prin metode cromatografice şi electroforetice.

Multiplicarea virală pe culturi celulare se traduce prin:

a) *Efectul citopatic* (ECP) (specific de grup). La microscop se observă rotunjirea celulelor, creşterea refringenţei lor, desprinderea în mediu. Degenerarea completă a culturii se produce în 24—48 ore. Unele tipuri antigenice prezintă particularităţi proprii. Astfel, unele virusuri ECHO şi virusuri Coxsackie A21—24 necesită o adaptare prin pasaje succesive pe culturile celulare sau pot da un ECP parţial, într-o zonă limitată a culturii.

Celulele renale embrionare umane infectate cu virus ECHO şi colorate cu metoda Feulgen au fost studiate de Sakarov şi colab. (1976) şi Gardevska (1980) care au pus în evidenţă, chiar din primele ore de la inoculare, activarea heterocromatinei nucleilor infectaţi, caracteristică pentru sinteza acizilor nucleici.

La microscopul electronic s-a constatat că multiplicarea virusului (ECHO 22 şi ECHO 23) este însoţită de agregarea şi marginarea cromatinei, de modificări degenerative ale membranelor celulare inclusiv a celei nucleare, ale mitocondriilor şi ale reticulului endoplasmatic neted şi rugos. Particulele virale apar iniţial la periferia veziculelor din zona nucleară şi se deplasează în direcţia membranei citoplasmatice (Trant şi Jamison, 1975; Jamison, 1974; Shahrabadi şi Morgante, 1977).

b) *Incluzii virale* în celule cultivate apar inconstant sub forma unor mase acidofile citoplasmatice dispuse paranuclear şi care îşi măresc treptat diametrul (Jamison, 1974).

c) *Formarea de plaje.* Dacă imediat după inocularea unei culturi celulare cu virus, monostratul de celule este acoperit cu un strat de agar în care s-a înglobat mediu nutritiv şi un indicator de viabilitate celulară (ex. roşu neutru), infecţia secundară a culturii după primul ciclu de dezvoltare nu se mai poate generaliza. Ea rămîne localizată, datorită agarului, în jurul celulelor infectate primar şi se întinde numai din aproape în aproape, de la celulă la celulă, cu degenerare secundară; aceasta provoacă şi virarea roşului neutru spre galben, semn al morţii celulare. Pe fondul roz al stratului celular, se pot observa pete gălbui, cu o mărime, formă şi evoluţie proprie tipului de enterovirus. Metoda este utilizată pentru studii cantitative, obţinerea de variante de virusuri şi pentru caracterizarea unor enterovirusuri (Cristea şi Cajal, 1972; Yoshii şi Koho, 1978; Sefčovičova, 1977).

d) *Apariţia populaţiei hemaglutinante* pentru unele tulpini de virusuri ECHO.

e) *Modificări de pH* (care stau la baza testului de inhibiţie metabolică, o metodă mai veche de detectare a multiplicării virale). În culturile în care virusul s-a multiplicat şi a afectat celulele, metabolismul nu se mai desfăşoară normal iar mediul la care se adaugă un indicator nu virează în galben, ci rămîne roşu.

f) *Prezenţa antigenului viral* în culturi poate fi demonstrată prin imunofluorescenţă directă sau indirectă, cu anticorpi marcaţi sau cu microscopul electronic; metodele sînt utile mai ales în fazele precoce ale infecţiei virale.

Scanned with OKEN Scanner

g) *Producerea de enzime specifice* ca lacticodehidrogenază, alanin-aminotransferază, aspartaminotransferază, fructozodifosfataldolază, fosfatază alcalină, ARN-polimerază etc. (Klöcking şi colab., 1974 a, b; Matsumoto şi Tagaya, 1979).

h) *Modificări ale cariotipului* speciei ţesutului de origine a culturii: număr de cromozomi, anomalii structurale etc. (Amcenkova şi colab., 1980).

2.4.2. ANIMALE DE LABORATOR

Proprietatea patogenă a enterovirusurilor pentru unele animale de laborator mai frecvent utilizate este redată în tabelul 2.4.

Tabelul 2.4

Patogenitatea enterovirusurilor pentru animale de laborator

Animale de laborator	Poliovirus	Virusuri Coxsackie		Virusuri ECHO	Noi tipuri antigenice
		A	B		
Maimuţă	Neuropatogenitate	forma inaparentă[a]	forma inaparentă[a]	nu[b]	71
Şoarece sau hamster nou-născut	nu[d]	Paralizie flască	Paralizie spastică	nu[c]	71

Excepţii: [a] ocazional paralizie, cardite etc. Coxsackie A7 : neuropatogenitate
[b] cu excepţia tipurilor 1, 3
[c] cu excepţia tipului 9
[d] cu excepţia tipului 2

Se poate remarca că polivirusurile se caracterizează prin neuropatogenitate pentru maimuţă (cu excepţia tipului 2, la care şobolanul de bumbac şi şorecele sînt de asemenea sensibili), virusurile Coxsackie pentru şoarece sau hamster nou-născut, iar virusurile ECHO prin lipsa de patogenitate pentru ambele gazde de laborator. Totuşi, aşa cum reiese din tabel, există cîteva tipuri antigenice care fac excepţie (creînd dificultăţi în identificare şi clasare).

Virusurile Coxsackie, pe baza distribuţiei leziunilor şi a aspectului clinic al bolii experimentale, au fost separate în două grupe: *grupa A*, care determină paralizie flască şi leziuni distructive întinse ale muşchilor scheletici şi *grupa B*, care determină paralizii spastice, uneori aceleaşi leziuni în muşchi, în plus necroză grăsoasă pancreatică, miocardită focală şi encefalomielită. (Detalii asupra aspectului morfopatologic al organelor pentru cele două grupe de virusuri Coxsackie în capitolul „Diagnostic de laborator").

La maimuţe, inocularea parenterală a enterovirusurilor nepoliomielitice produce de regulă o infecţie subclinică, rar paralizie sau/şi cardite; infecţia este însoţită de producere de anticorpi specifici. S-a reuşit reproducerea herpanginei la maimuţe cu o tulpină de virus Coxsackie A4 izolată de la bolnav (Simkova şi Petrovicova, 1972). Enterovirusul 71 a determinat la maimuţe leziuni similare cu cele date de poliovirus, dar de mai mică intensitate. Este afectat corpul striat şi alte zone corticale mai rar

Scanned with OKEN Scanner

afectate de poliovirus; se observă în special leziuni difuze ale scoarţei cerebrale (Robinzon şi colab., 1978). În unele condiţii, infecţia pe cale orală s-a manifestat ca şi cea perenterală, urmată de apariţia de anticorpi specifici.

Şoarecele nou-născut reprezintă singura gazdă de laborator disponibilă pentru izolarea majorităţii tipurilor antigenice de Coxsackie A şi pentru întreţinerea unui număr de virusuri Coxsackie B.

S-a scos în evidenţă importanţa liniei genetice de şoareci utilizaţi pentru diagnostic în infecţiile cu virusuri Coxsackie. Astfel, s-a stabilit că linia C3H este rezistentă pentru toate cele 6 tipuri antigenice de virus Coxsackie B în timp ce linia BALB/c este cea mai receptivă (Minnich şi Ray, 1980; Voiculescu şi colab., 1980).

Enterovirusul 71 care determină îmbolnăviri poliomielitiforme posedă, spre deosebire de poliovirus, proprietăţi miotrope şi neurotrope accentuate la şoarecele alb nou-născut, similare cu cele determinate de virusurile Coxsackie A7, A14 şi A16 (Robinzon şi colab., 1978; Koroleva şi Graceva, 1980).

Localizarea antigenului viral în ţesuturile şi organele şoarecelui nou-născut şi aspectul leziunilor au fost studiate prin microscopie electronică, imunofluorescenţă şi alte mijloace moderne de investigaţie (Bienz-Isler şi colab., 1970; Harb şi Burch., 1975; Sethi şi Lipton, 1981; Barnstein şi Gandzii, 1981). În ţara noastră, încă din anul 1959 au fost studiate cu microscopul electronic leziunile miofibrilelor la şoarecii infectaţi cu virus Coxsackie (Portocală, 1959).

Patogenitatea virusurilor Coxsackie se manifestă după inocularea intracerebrală, intraperitoneală sau intramusculară, numai la animalele de 24, maximum 48 de ore; ea scade odată cu vîrsta şi este absentă la animalul adult. Contaminarea per orală a şoarecelui nou-născut este de asemenea posibilă, răspîndirea virusurilor Coxsackie, reproducerea şi persistenţa lor în ţesuturi fiind similare cu cele obţinute după contaminarea parenterală.

O serie de enzime intestinale ca sucraza, maltaza, aminopeptidaza au o acţiune stimulatoare asupra infecţiei şoarecelui sugar cu virus Coxsackie (Hammond şi Rosenberg, 1972).

Mecanismele fiziopatologice ale infecţiei intestinale cu virusuri Coxsackie B au fost pe larg studiate de Loria şi colab. (1974 a, b, 1977) şi de Kibrick şi Loria (1977).

Virusurile ECHO tip 9 şi, după adaptare, tipurile 7, 8, 11, 13 ş.a. pot să determine leziuni similare la şoarecele nou-născut (Aderca, 1962). Răspunsul morfopatologic depinde de vîrsta animalului: şoarecii nou-născuţi prezintă totdeauna leziuni musculare; ambele tipuri de leziuni (sistem nervos şi muşchi) apar la şoareci mai în vîrstă (14 zile). Pentru celelalte tipuri de virusuri Coxsackie A (7, 9, 13, 15, 17, 18 şi 19) testate pe şoareci albi adulţi, leziunile histologice sînt absente, dar virusul poate să fie evidenţiat în sistemul nervos. Jacob şi colab. (1980), inoculînd tulpini la şoareci de vîrste diferite, au demonstrat că patogenitatea virusurilor Coxsackie B1—B4 pentru şoarecele alb nou-născut (sub 48 ore) s-a tradus prin encefalită galopantă iar la şoarecele adult prin leziuni ale ţesutului cardiac şi ale pancreasului.

Modificări ale enzimelor oxidative din organe (succindehidrogenază şi citocromoxidază) au fost puse în evidenţă de Ciplea şi colab. (1971) şi Constantinescu şi colab. (1971) la şoareci de 15 zile infectaţi cu virus Coxsackie A10.

Scanned with OKEN Scanner

În anumite condiţii fiziologice sau experimentale rezistenţa şoarecelui adult faţă de enterovirusuri a putut fi învinsă. Astfel, inocularea virusului Coxsackie B3 la animale gravide a determinat leziuni mai grave în comparaţie cu animalele martore, virusul putînd fi pus în evidenţă în toate organele (Andruscenko şi Matveev, 1970). De asemenea, experimental s-a reuşit încă de mulţi ani potenţarea infecţiei cu virus Coxsackie la şoarecele adult prin iradiere cu raze X, beta şi gama (Cajal şi colab., 1959 a, b; 1960); prin cortizon (Marinescu şi Liu, 1960), prin tratament cu rezerpină (Grodums, 1972), prin hipoxie sau presiune (Gilmore şi Gordon, 1974), prin săruri de aur (Kabiri şi colab., 1978) etc. În majoritatea din aceste experimente, la animalele tratate, titrul virusului a fost de 4—6 ori şi chiar de 10 ori mai mare comparativ cu animalele netratate.

Au mai fost relatate rezultate privind patogenitatea enterovirusurilor şi pentru alte animale de laborator. Astfel, virusurile Coxsackie sînt patogene pentru hamsteri, dihori şi merioni nou-născuţi, determinînd după inocularea intraperitoneală, intracerebrală sau intramusculară leziuni similare cu cele de la şoarecele nou-născut. Şobolanul alb a putut fi infectat cu virus Coxsackie A13 şi A18, fiind considerat de către Kogut şi colab. (1978) ca un model experimental pentru evidenţierea cardiotropismului acestora. Enterovirusul 71 inoculat la şobolanul de bumbac a manifestat un miotropism caracteristic (Robinzon şi colab., 1978; Koroleva şi Graceva, 1980). La iepure s-au evidenţiat leziuni hepatice după inocularea virusului Coxsackie direct în vena portă (Marinescu şi colab., 1958).

2.5. MULTIPLICAREA

Contactul dintre virusul matur şi celula-gazdă receptivă este urmat de pătrunderea virusului prin membrană în interiorul celulei şi, după un interval variabil, de apariţia, în citoplasmă ori în nucleul celulei-gazdă, de noi corpusculi virali. Întregul proces de multiplicare se desfăşoară în interiorul şi pe seama celulei-gazdă care furnizează materia primă şi energia pentru mecanismele de sinteză implicate în producţia de noi virusuri. Atît proteinele virale cît şi acidul nucleic se constituie pe seama rezervelor de aminoacizi şi nucleotide celulare sau pe seama produselor lor de degradare. În ultimul timp, numeroase date asupra multiplicării enterovirusurilor au fost obţinute prin studii cu microscopul electronic, prin cercetări biochimice, prin investigaţii cu izotopi radioactivi şi prin studii cu ajutorul anticorpilor marcaţi (Hecker şi colab., 1974; Roesing şi colab., 1975; Zemlianski, 1978; Zilka şi colab., 1978a etc.).

Enterovirusurile fac parte din grupul virusurilor cu genom „pozitiv" la care acidul nucleic izolat este infecţios, virusul respectiv putînd fi generat intracelular pornind de la o singură moleculă de acid nucleic.

Se admite că multiplicarea are loc în următoarele stadii (Duca, 1979):

Adsorbţia particulei virale pe membrana celulei receptive care are loc între grupări specifice din capsida virusului şi receptorii membranei celulare (lipoproteine). Structura proteică a capsidei enterovirusurilor prezintă afinitate numai pentru anumite tipuri de celule şi anume pentru celule de origine umană şi simiană, în timp ce ARN debarasat de capsida proteică este încorporat în plus de celule de iepure, hamster, porc, cobai şi cocoş (pentru un singur ciclu reproductiv). Cords şi colab. (1975) expe-

Scanned with OKEN Scanner

rimentînd cu virus Coxsackie A13 au ajuns la concluzia că, pentru adsorbţia virusului pe receptori celulari, VP4 este indispensabilă.

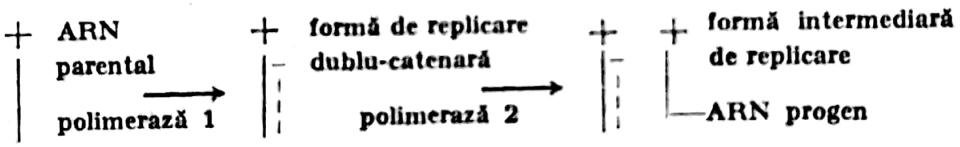
În studiul aderării (Coxsackie B3) la receptorii specifici ai celulelor receptive (HeLa) s-a stabilit că contactul virionilor cu celulele duce la modificarea particulelor virale şi la trecerea lor în forma A ; particulele A se găsesc în interiorul şi la suprafaţa celulei ; ele au o viteză redusă de sedimentare, sînt lipsite de polipeptidul viral (VPH) şi conţin ARN infecţios insensibil faţă de ARN-ază (McGeady şi Cromwel, 1979). Orice factor care împiedică adsorbţia duce la suspendarea infecţiei. În unele situaţii, adsorbţia pe receptorii celulari nu mai este urmată de etapele următoare de multiplicare.

Pătrunderea virusului în celulă are loc după faza de decapsidare, ARN-ul fiind cuplat doar cu o mică parte din proteine ; pătrunderea şi decapsidarea se face printr-un fenomen de viropexie.

Pătrunderea virusului este urmată de o fază de eclipsă în care virusul îşi pierde identitatea iar constituenţii lui (acidul nucleic şi proteina) se amestecă cu constituenţii proprii ai celulei. În acest interval, virusul nu este infectant. S-a demonstrat prin microscopie electronică prezenţa în citoplasmă a unor vacuole de fagocitare conţinînd particule virale intacte, în primele ore de la infectarea celulei.

Biosinteza componentelor virale are loc după un mecanism astăzi binecunoscut, existînd suficiente elemente privind replicarea ARN viral şi sinteza de polipeptide capsidale şi cu funcţii enzimatice.

Replicarea ARN are loc în conformitate cu mecanismul de împerechere a bazelor descris de Watson şi Crick, urmînd apariţia unei forme de replicare dublu-catenare şi sinteze de ARN-progen după modelul catenei nou-sintetizate cu polaritate negativă :



Sinteza proteinelor este în continuare codificată atît de ARN parental (polaritate „+" şi deci recunoscut de ribozomi), cît şi de ARN progen (polaritate de asemenea pozitivă), ambele molecule purtînd o informaţie policistronică.

În acest fel se sintetizează o singură proteină (VP) după care, prin clivaj enzimatic, se obţin atît proteinele structurale (CVP) cît şi cele enzimatice (NCVP).

Pentru uşurarea interpretării prezentăm şi cîteva caracteristici fizico-chimice ale genomului şi proteinelor respective.

Genom = ARN monospiralat (monocatenar)
Sediu de replicare = citoplasma
Mărimea genomului ($\times 10^6$ daltoni) = 2,6
Număr de polipeptide = 6
Număr de polipeptide virale identificate = 4

Reiese clar că ARN din genomul picornavirusurilor (GM $2,6 \times 10^6$) are aceeaşi polaritate cu mARN, de aceea este adecvat translaţiei directe şi ca urmare se realizează un polipeptid gigant care este apoi clivat de enzime proteolitice în cele patru polipeptide structurale capsidale. Pentru declanşarea procesului de replicare a acidului nucleic este necesară sinteza

prealabilă precoce în celula infectată a unei enzime, ARN-polimeraza ARN-dependentă.

Replicarea acidului nucleic viral a fost demonstrată prin procedee de separare preparativă şi prin folosirea de precursori marcaţi cu izotopi radioactivi. Sinteza proteinelor structurale de tip viral are ca sediu polizomii. ARN acţionează el însuşi ca mesager. Asamblarea şi maturarea particulelor se traduce la microscopul electronic prin apariţia unor formaţiuni cristaliforme cu simetrie specifică.

Eliberarea particulelor virale are loc într-o ultimă fază realizîndu-se prin intermediul reticulului endoplasmatic. Virusul nou-format se acumulează formînd aglomerări de corpusculi cu aranjament ordonat şi stratificare bidimensională şi care părăsesc celula după liza acesteia.

Deşi se admite că multiplicarea are loc în citoplasmă, Follet şi colab. (1975), studiind mecanismele de multiplicare a virusurilor ECHO şi poliomielitice, au arătat că acestea s-au multiplicat mult mai slab în celulele BS—C—1 enucleate în comparaţie cu cele nucleate, ceea ce sugerează că multiplicarea enterovirusurilor are loc atît în citoplasmă cît şi în nucleu.

Un studiu detaliat asupra structurii şi asamblării picornavirusurilor, luînd ca model poliovirusul, a fost publicat de Rueckert (1978).

Rezumînd, menţionăm că multiplicarea enterovirusurilor, în general, se face după un ciclu litic, citocidal, productiv, care se soldează cu moartea celulei-gazdă şi eliberarea de virioni compleţi, incapsidaţi, maturi şi infectanţi. Tulpinile de virus care sînt la originea ciclului productiv citocid sînt etichetate drept virulente şi se caracterizează prin capacitatea de transmisie orizontală; pe plan clinic, de regulă, se exprimă prin boala acută. Este posibil ca în unele situaţii să aibă loc şi o altă modalitate de multiplicare, necitocidală cronică-ciclică, care determină infecţii cronice persistente (vezi capitolul 3).

2.6. PROPRIETĂŢI ANTIGENICE. IMUNITATE. INTERFERENŢĂ

2.6.1. PROPRIETĂŢI ANTIGENICE

Toate enterovirusurile sînt dotate cu proprietăţi antigenice care se traduc, după pătrunderea în organismul omului sau animalelor, prin apariţia anticorpilor specifici (neutralizanţi, hemaglutinoinhibanţi, precipitanţi, fixatori de complement). S-a descris şi existenţa unor antigene fixatoare de complement de grup pentru virusurile Coxsackie B (Fenner şi White, 1977).

De-a lungul timpului, s-au pus în evidenţă înrudiri antigenice între diferitele tipuri de enterovirusuri cum ar fi între virusurile ECHO 6 şi 30, tip 1,8 şi 12, 12 şi 13, 4 şi 6, 14 şi 15, 15 şi 16, 22 şi 23; între virusurile ECHO 6, 9 şi polio 1, ECHO 20 şi Coxsackie B1, 3, 4 şi 5 etc. (Aderca, 1962). Mai recent, au fost evidenţiate prin imunofluorescenţă înrudiri antigenice între Coxsackie A23 şi ECHO 9 (Fenner şi White, 1977; Hagiwara şi colab., 1978).

Odată cu perfecţionarea metodelor de laborator s-a constatat, prin reacţia de neutralizare, mai întîi, şi apoi prin studiul markerilor genetici, că unele tipuri antigenice de enterovirusuri nu au o structură antigenică uniformă, prezentînd variante antigenice, exemplul clasic fiind reprezentat de virusul ECHO tip 6, 6′ şi 6″ (Aderca, 1962; Botiş şi colab., 1972;

Scanned with OKEN Scanner

Savcenko, 1974). Variante intratipice au mai fost descrise pentru virusul ECHO tip 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 19, 20, 30, 33 (Aderca, 1962; Savcenko, 1974; Lewenton—Kriss şi Schaeffer, 1971; Abraham şi Inverso, 1977), pentru virusurile Coxsackie A tip 4, 5, 7, 9, 10, 16 (Voiculescu, 1966; Uesugi, 1972; Soda, 1971) pentru virusurile Coxsackie B1, 5 şi 6 (Richter şi colab., 1972; Brown şi Wild, 1974; Subrahmanyan şi colab., 1973) şi pentru EV 70 (Kawamoto, 1980).

Variante intratipice au fost descrise cel mai adesea printre tulpinile recent izolate „sălbatice", care se deosebeau de cele prototip de laborator (Aderca, 1962).

În condiţii de laborator au putut fi obţinute mutante pentru diferite tipuri antigenice de enterovirusuri. Mutantele au putut fi obţinute prin treceri succesive pe culturi celulare uneori la diferite temperaturi (Rouhandeh, 1972; Jablonski, 1971), prin tratarea cu unele droguri, ca 5-fluoruracil (Adrian şi colab., 1979), cortizon (Voiculescu şi colab., 1969), prin selectarea prin caracterul plajelor (Iavorovskaia şi colab., 1972).

Pentru caracterizarea variantelor intratipice şi a mutantelor se recurge la o serie de markeri genetici: caracterul plajelor, comportament faţă de unele substanţe (cistină, bentonită etc.), termolabilitate, proprietăţi hemaglutinante, capacitate de eluţie pe coloane DEAE, patogenitate, antigenitate etc. (Soda, 1971; Koroleva şi colab., 1972 a, b; Savcenko, 1974; Sirobokov, 1978; Totsuka şi colab., 1978).

2.6.2. IMUNITATE. INTERFERENŢĂ

Enterovirusurile nepoliomielitice determină o stare de imunitate consecutiv atît bolii clinic aparente, cît şi a celei inaparente, subclinice, fapt dovedit prin incidenţa ridicată a posesorilor de anticorpi faţă de diferite tipuri antigenice la persoane care nu au avut în antecedente o îmbolnăvire enterovirală. În mod natural, starea de imunitate poate fi transmisă pasiv de la mamă la făt. Starea de imunitate mai poate fi dobîndită activ sau pasiv, prin administrarea de vaccinuri sau imunoglobuline specifice. Infecţia naturală la om este urmată de răspuns umoral prin anticorpi şi, totodată, de răspuns din partea sistemului celular.

Anticorpii apar în medie către a 15-a zi de la infecţie cu variaţii de la 3—4 zile pînă la 20—25 zile, titrurile maxime fiind atinse în medie în a 4-a săptămînă. După tipul lor, anticorpii sînt prezenţi în sînge un timp variabil: anticorpii neutralizanţi şi cei hemaglutinoinhibanţi (dacă este cazul) se menţin toată viaţa, în timp ce anticorpii fixatori de complement dispar după cîteva luni. Toţi aceşti anticorpi sînt specifici de tip. Răspunsul prin anticorpi şi acţiunea lor protectoare au fost dovedite şi pe animale de laborator (maimuţă, cobai, iepure, şoarece alb etc.). Anticorpii macroglobulinici 19S (sulfhidril-sensibili) au o apariţie rapidă şi o viaţă scurtă, în timp ce anticorpii 7S (sulfhidril-rezistenţi) sînt detectaţi în perioada de convalescenţă.

Participarea mecanismelor de imunitate celulară în infecţiile enterovirale a fost demonstrată prin numeroase studii (Woodruff şi Woodruff, 1971; Bociarov şi Salaurova, 1979).

Experimental, pe şoarece nou-născut, s-a dovedit că anticorpii au acţiune protectoare în special atunci cînd se asociază cu exsudat peritoneal de la şoarece adult, funcţiile macrofagelor avînd un rol stimulator (Rager-Zisman şi Allison, 1973). Prin metoda imunoelectroforezei, s-a constatat

Scanned with OKEN Scanner

creşterea cantitativă a IgG în special în lor ceea ce indică prezenţa reacţiilor imun-specifice în sistemul nervos central (Kostic şi colab., 1979). În plus, Hozinskii şi colab. (1978) au studiat dinamica de formare şi specificitatea hipersensibilităţi de tip întîrziat după infecţiile experimentale cu virus Coxsackie B3 şi enterovirusul 71.

Posibilitatea transferului pasiv de imunitate de la mamă la făt a fost evidenţiată în cazul enterovirusurilor prin punerea în evidenţă a anticorpilor la făt; titrul matern întrece pe cel placentar fetal. S-a constatat că anticorpii materni neutralizanţi şi fixatori de complement sînt transmişi şoarecilor sugari prin lapte şi colostru în toată perioada de lactaţie; rezistenţa transmisă în acest mod şoarecilor nou-născuţi este specifică faţă de tulpina de virus cu care s-a făcut imunizarea animalului adult.

Dinamica imunizării şi unele caractere ale imunităţii şoarecilor nou-născuţi de la mame vaccinate a fost studiată de M. Duca şi colab. (1958). S-a arătat că o rezistenţă mai puternică faţă de inocularea de virus Coxsackie s-a obţinut cînd distanţa între vaccinarea completă a mamei şi naşterea puilor a fost mai mare. Starea de rezistenţă transmisă descendenţilor a fost strict specifică, condiţionată de titrul anticorpilor din serul mamei.

Crearea unei imunităţi specifice prin vaccinare (care s-a realizat cu atîta succes în infecţiile cu virus poliomielitic) întîmpină serioase dificultăţi în cazul infecţiilor cu enterovirusuri nepoliomielitice datorită, în primul rînd, multitudinii tipurilor antigenice. Totuşi, o serie de studii privind posibilităţile de inactivare a enterovirusurilor nepoliomielitice şi de păstrare a proprietăţilor lor antigenice s-au efectuat în ţara noastră încă din anul 1958 de către E. Duca şi colab., pentru virusul Coxsackie A10 inactivat prin catadinizare; la rîndul lor, Constantinescu şi colab. (1971) au cercetat, în vederea preparării unui vaccin, capacitatea imunogenă a unei tulpini de Coxsackie A10 adaptate pe culturi celulare şi care şi-a pierdut patogenitatea pe şoarece sugar.

În sfîrşit, plecînd de la prezenţa anticorpilor anti-Coxsackie şi -ECHO în imunoglobulinele (Ig) umane normale standard, se admite că acestea au o acţiune protectoare (Zavate şi Ivan, 1967; Dinculescu şi colab., 1968; Voiculescu şi colab., 1969).

Interferenţa constă din inhibarea multiplicării unui virus datorită prezenţei în celulă a unui alt virus. În cazul enterovirusurilor, fenomenul de interferenţă se poate manifesta faţă de alte virusuri sau chiar între diferitele tipuri antigenice proprii.

În ceea ce priveşte alte virusuri, au fost efectuate studii privind interferenţa faţă de virusul vaccinal (Ştefanesco şi colab., 1969), şi virusul herpes simplex (Zilka şi colab., 1978).

Fenomenul de interferenţă între diferitele tipuri antigenice de enterovirusuri a fost demonstrat prin studii experimentale *in vitro* (pe culturi celulare) şi *in vivo* (pe animale) şi prin observaţii epidemiologice în condiţii naturale.

Pe culturi celulare fibroblastice de embrion uman, Cajal şi colab. (1969 a, b) au studiat efectul infecţiei mixte a virusului Coxsackie A7 şi a poliovirusului tip 3, constatînd şi un fenomen de îmbogăţire a virusului inactivat (poliovirus) asupra capacităţii formatoare de plaje a virusului activ (Coxsackie); în cazul infecţiilor mixte, izolările pe culturi celulare pot să reuşească doar pentru unul din enterovirusuri, cel interferat rămînînd neevidenţiabil. Tratarea inoculului cu ser imun corespunzător primului virus permite izolarea celui de-al doilea.

Scanned with OKEN Scanner

Fenomenul de interferenţă a fost pus în evidenţă şi între diferite tipuri antigenice de Coxsackie sau ECHO şi virusul poliomielitic. Este necesar un interval de cel puţin 6 ore între inocularea pe culturi celulare a virusului interferent şi cea a virusului atacant, pentru ca primul să poată elibera interferon (Ştefanesco şi colab., 1969; Aderca, 1962; Danielescu, 1962).

În practica epidemiologică, prezenţa enterovirusurilor nepoliomielitice poate influenţa negativ eficienţa vaccinării antipoliomielitice prin împiedicarea implantării tulpinilor atenuate, datorită unui fenomen de interferenţă, aşa cum s-a presupus că aceasta ar avea loc în zonele tropicale. Se citează de asemenea că după introducerea vaccinării antipoliomielitice, creşterea morbidităţii prin infecţii cu virusuri Coxsackie şi ECHO ar putea fi explicată şi prin fenomenul de interferenţă (Zavate, 1970).

În ceea ce priveşte mecanismul intim al interferenţei se presupune fie că fenomenul este mediat de interferon, fie că are loc modificarea de către primul virus a receptorilor sau a căilor metabolice, care devin astfel inaccesibile celui de-al doilea virus; interferenţa nu ţine de procese imunitare.

S-a presupus că interferonul inhibă producerea de ARN-polimeraza şi a formelor mono- şi dublu-catenare de ARN viral în celulele infectate. Falcoff (1979) arată că într-o celulă tratată cu interferon multiplicarea este oprită. Virusul pătrunde în celulă dar nu poate să se reproducă, celula fiind protejată. În organism, interferonul joacă însă desigur un rol determinant pentru a împiedica evoluţia fatală a unor boli virale.

După Duca (1979) infecţia mixtă cu două sau mai multe virusuri diferite, situaţie care survine frecvent atît natural cît şi experimental, se poate solda în cazul enterovirusurilor, cu un alt mod de interacţiune în care nu sînt implicaţi acizii nucleici (ca în interacţiunile genetice), ci produsele de expresie fenotipică a acestora. Mixajul fenotipic constă din asocierea fenotipului unui virus cu genotipul altui virus aşa cum acesta a fost descris pentru genomul de poliovirus încorporat în capsida virusului Coxsackie. Aceste particule sînt neutralizate de serul imun anti-Coxsackie şi se ataşează de receptorii celulelor receptive pentru acest virus.

BIBLIOGRAFIE

ABRAHAM A. A., INVERSO K. (1977), *Isolation and characterization of an echovirus intratypic variant of ECHO virus 33*, Arch. Virol., **53**, *1—2*, 39—44.

ADERCA I. (1962), *Virusurile ECHO*. În: *Elemente de inframicrobiologie specială*, sub redacţia S. Şt. Nicolau, Ed. medicală, Bucureşti, pp. 106—127.

ADERCA I., IFTIMOVICI M., IANCONESCU M., DANIELESCU G., MIHAIL A. (1963), *Comparative investigation on the susceptibility of 8 cell strains to various viruses*, Stud. cerc. Inframicrobiol., **14**, *2*, 171—175.

ADERCA I., IFTIMOVICI M. (1971), *Cultivabilitatea* in vitro *a celulelor renale de Cercopithecus aethiops. Încercări de obţinere de linii celulare*, Stud. Cerc. Inframicrobiol., **22**, *4*, 331—337.

ADRIAN TH., ROSENWIRTH B., EGGERS H. I. (1979), *Isolation and characterization of temperature-sensitive mutans of echovirus 12*, Virology, **99**, *2*, 329—339.

AKERS I. E., BURLINGHAM B. T. (1979), *Partial characterization of genome complex isolated from complete and incomplete Coxsackie virus B4*, Abst. 79th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los Angeles, Calif., p. 254.

ALVAREZ M. E., O'BRIEN R. T. (1982), *Effect of chlorine concentration on the structure of poliovirus*, Appl. environ. Microbiol., **43**, *1*, 237—239.

AMCENCOVA A. M., NAROCLEANSCHII A. N., HESIN I. E., GULEVICI N. E. (1980), *Izmenenie cariotipa cultur celoveceschih cletoc v profese reversii ciuvstvitelnosti c virusam Coxsackie*, Vopr. Virusol., *3*, 311—314.

Scanned with OKEN Scanner

ANDRUSCENCO N. I., MATVEEV Y. V. (1970), *Virusologhicescoe i morfologhicescoe izucenie Coxsackie infecţii u berementh mişei*. Vopr. Virusol., *1*, 68–72.
BARSTEIN I. A., GANDZII G. P. (1981), *Localizaţia i reproducţia virusa Coxsackie v popere-cino polosatoi mişite po danim electronoi microscopii*. În : Conf. *Virusi i virusn. infecţii celoveca*, Moscova, p. 41.
BEATRICE S. T., KATZE M. G., ZAJAC B. A., CROWELL R. L. (1980), *Induction of neutralizing antibodies by the Coxsackie B3 viron polypeptide VR 2*, Virology, **104**, *2*, 426–438.
BELL E. D., KOSGROWN B. P. (1980), *Diagnostic des affections entérovirales par l'utilisation de R. D.*, Bull. W.H.O., **58**, *3*, 303–308.
BERGE T. O., JEWETT R. L., BLAIR W. O. (1971), *Preservation of enterovirus by freeze-drying*, Appl. Microbiol., **22**, *3*, 850–852.
BIENZ-ISLER G., BIENZ K., WEISS M., LOEFFLER H. (1970), *Coxsackie virus infection, in skeletal muscles of mice. I. Cell and nucleus alteration*, Arch. Ges. Virusforsch., **31**, *3–4*, 257–265.
BOCIAROV E. F., SALAUROVA O. V. (1979), *Effect of Coxsackie virus infection on the immune response of mice to sheep erythrocytes*, Acta virol., **23**, *4*, 351–353.
BONDARENKO V. I., GRIGORIEVA L. V. (1977), *O profilactiche enterovirusnth infecţii*, Vrac. Delo, *3*, 142–145.
BOTIŞ S., BABA C., DANIELESCU G., CAJAL N. (1972), *Cooperation in growth of guanidine-dependent and guanidine-sensitive strains of ECHO viruses 6 and 7 in the course of mixed infection of human embryo fibroblasts*, Acta virol., **16**, *4*, 273–280.
BROWN F., WILD F. (1974), *Variation in the Coxsackie virus type B5 and its possible role in the etiology of swine vesicular disease*, Intervirology, **3**, *1–2*, 125–128.
BURCH G., HARB I. (1975), *Coxsackie B4 virus crystal formation in mouse pancreas*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **149**, *4*, 893–895.
CAJAL N., MATEESCU S., COPELOVICI Y. (1959a), *Susceptibility of adult mice to the pathogenic action of Coxsackie virus following ionizing irradiation (x and beta)*, Acta virol. *3*, (suppl.), 107–112.
CAJAL N., MATEESCU S., COPELOVICI Y., PACURARU E. (1959b), *Transmission of the Coxsackie virus (A2) to adult mice treated with P^{32}*. Com. Acad. R.P.R., **9**, *1*, 81–84.
CAJAL N., BURDUCEA O., MATEESCU S., MARINESCU GH., CEPLEANU M., COPELOVICI Y. (1960), *The evolution of some experimental diseases (influenza, poliomyelitis, Coxsackie, rabies, herpes) under the action of radioactive phosphorus and iodine (P^{32} and J^{131})*, Acta virol. hung., **7**, *2*, 181–185.
CAJAL N., BOTIŞ S., BABA C., BABOS A., BILLER S. (1969a), *Mixed infection of human embryo fibroblasts with attenuated poliovirus type 3 and Coxsackie virus A7*, Rev. roum. Inframicrobiol., **6**, *1*, 3–13.
CAJAL N., BOTIŞ S., BABA C., BABOŞ A., BILLER S., DANIELESCU G. (1969b), *Mixed infection of human embryo fibroblasts with attenuated poliovirus 3 and Coxsackie virus A*. Proc. XIIth Symp. Europ. Assoc. Polio. Allied disease, Bucharest, 1969, 491–497.
CAJAL N., CRISTEA A., BOTIŞ S. (1972), *Mathematical models of the evolution of enteroviral population*. În : Abst. Works of the „Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, 1971–1972, p. 10.
CIPLEA A. G., VOICULESCU C., TOMA M., GHEORDUNESCU V. (1971), *Activity of mitochondrial oxidative enzymes in tissues from young mice infected with Coxsackie A10 virus*. Arch. roum. Pathol. exp. Microbiol., **30**, *3–4*, 367–377.
CONSTANTINESCU N. M., CAJAL N., ZAVATE O. (1962), *Considération sur un « entérovirose » : l'hépatite épidemique*, Vol. al III-lea Congr. Intern. Path. Infect., Bucureşti, 8–11 oct., p. 765–772.
CONSTANTINESCU S. P., VOICULESCU C., BRUCHER I. (1971), *Studiu electronooptic şi histoenzimatic privind leziunile mitocondriale în ţesuturile şoarecilor tineri infectaţi cu tulpinile virale Coxsackie A 10 de patogenitate diferită*. Vol. al II-lea Congr. Nat. Microbiol. Med., 15–17 sept., Bucureşti, p. 115.
COOPER P. D., AGOL V. I., BACHRACH H. L. ş.a. (1978), *Picornaviridae : second report*, Intervirology, **10**, *3*, 165–180.
CORDS C. E., JAMES C. G., MC LAREN L. C. (1975), *Alternation of capsid proteins of Coxsackie A13 by low ionic concentration*, J. Virol., **15**, *2*, 244–252.
CRISTEA AL., CAJAL N., BOTIS S. (1972), *Considérations mathématiques sur la variation des dimension des plages chez certaines souches de virus de groupe picorna*, Rev. roum. Méd., **9**, *1*, 45–52.
DAHLING D. R., BERG G., BERMAN D., (1974), *BGM : A continuous cell line more sensitive than primary Rhesus and African green kidney cells for the recovery of viruses from water*. Hlth Lab. Sci., **11**, *4*, 275–282.

Scanned with OKEN Scanner

DANIELESCU G., ADERCA I., IFTIMOVICI M. (1962), *Interferenţa* in vitro *între virusul ECHO tip 9 şi virusul poliomielitic atenuat de tip 1 Sabin*. Stud. Cerc. Inframicrobiol., *1*, 81—88.

DINCULESCU M., VOICULESCU C., MITRICĂ N., BUIUC G. (1968), *Spectrul antiviral al imunoglobulinelor umane normale*. Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **27**, *1*, 1.

DRULAK M., WALLBANK A. M., LEBTAG Y. (1978a), *The relative effectiveness of commonly used disinfectants in inactivation of echovirus 11*. J. Hyg., **81**, 77—87.

DRULAK M., WALLBANK A. M., LEBTAG Y., WERBOSKI L., POFFENROTH L. (1978b), *The relative effectiveness of commonly used disinfectants in inactivation of Coxsackie-virus B5*, J. Hyg., **81**, *3*, 389—397.

DUBES G. R., MOSLIN A. M. (1980), *Effect of inactivator (S) formed from copper and phenol impurity(ies) on the sedimentation rate of transfective poliovirion RNA*, Arch. Virol., **66**, *1*, 45—51.

DUCA E., DUCA M., TOMESCU E. (1958), *Cercetări experimentale comparative asupra imunizării şoarecelui alb cu virus Coxsackie viu şi cu virus inactivat prin catadinizare*. În : Vol. Consf. Interreg. Polio. Enterovirusuri, Vatra-Dornei 22—24 mai, p. 15.

DUCA M., DUCA E., WASSERMAN L., TOMESCU E., CREŢEANU GH. (1956), *Cercetări asupra virusului Coxsackie în Moldova*. Stud. cerc. Şt. med. (Iaşi), *1*, 129—141.

DUCA M., DUCA E., TOMESCU E. (1958), *Cercetări asupra imunităţii şoarecilor nou-născuţi proveniţi din animale vaccinate faţă de virusul Coxsackie*. În : Vol. Consf. Interreg. Polio. Enterovirusuri, Vatra Dornei, 22—24 mai, p. 19.

DUCA M. (1979 a), *Virologie medicală*. În : *Microbiologie medicală* (de E. Duca, M. Duca, G. Furtunescu), Ed. didactică şi pedagogică, Bucureşti, p. 604—870.

DUCA M. (1979 b), *Probleme şi posibilităţi actuale în diagnosticul de laborator al infecţiilor virale*, Bacteriol. **24**, *2*, 65—79.

DUNKER A. K. (1974), *Structure of isometric viruses containing non-identical polipeptide chains*, J. Virol. **14**, 878—885.

EGGERS H. J. (1977), *Selective inhibition of uncoating of echovirus 12 by rhodanine. A study on early virus cell interaction*, Virol. **78**, *1*, 241—252.

EGGERS H. I., DETTE K., TSCHUNG T. S. (1978), *Chemotherapy of enterovirus-infected animals*. În : Vol. Abstr. IV Intern. Congr. Virologie, Hague, aug. 30—sept. 6, p. 124.

FALCOFF E. (1979), *Recherche sur les interférons*, La Recherche, *10*, 947—955.

FEDECIKO I. M. (1974), *Roli okremih etapiv vuglevodno-energheticeskovo obminu v reproducţii adenovirusu III typu ta virusu Coxsackie B1*, Microbiol J., **36**, *5*, 612—615.

FEDECIKO I. M. (1975), *Pro osoblevosti obminu neorganiceskih fosfativ u sistemi virus Coxsackie B1 — klitina KB*, Microbiol J., **37**, *5*, 616—618, 673.

FENNER F., WHITE D. (1976), *Picornaviridae*. În : *Medical Virology*, cap. 18, New York-San Francisco-London, Academic Press, 332—354.

FOLLETT E. A. C., PRINGLE C. R., PENNINGTON T. H. (1975), *Virus development in enucleate cells: ECHO-virus, poliovirus pseudorabies virus, reovirus, respiratory syncytial virus and Semliki Forest Virus*, J. gen. Virol., **26**, *2*, 183—196.

GALABOV A., SINDAROV L., VASSILEV G., VASSILEVA R. (1972), *Inhibitory effect of N-phenyl-N-aryl-or alkylthiourea derivatives on the multiplication of some picornaviruses (Coxsackie B1, ECHO 19 and foot-and-mouth disease virus) in cell cultures*, Arch. Ges. Virusforsch., **38**, *2—3*, 159—166.

GARDEVSKA V. (1980), *Morphological changes of human embryonal kidney cells infected with ECHO viruses*, Scripta Sci. med., **17**, 119—122.

GAUDIN O. G. (1964), *Les infections à entérovirus*. În : *Diagnostic des maladies à virus* (de R. Sohier), Ed. Méd. Flammarion, Paris.

GEVAUDAN P., PIERONI G., GEVAUDAN M. J., CHARNEL J. (1971), *Coxsackievirus maturation. I. Physiochemical factors*, Ann. Inst. Pasteur, **121**, *6*, 815—823.

GILMORE J. D., GORDON F. B. (1974), *Parabiosis and experimental infection 5. Effect of altered oxygen tension on Coxsackie B-1 infection in adult mice*, Airspace Med., **45**, *8*, 840—842.

GRODUMS E. J. (1972), *The effect of reserpine upon experimental Coxsackie virus B-3 infection in mice*, Canad. J. Microbiol., **18**, *5*, 577—582.

GRUIA M., MURGU M. (1965), *Cercetări asupra caracterului hemaglutinant a unor tulpini de virus ECHO*, Stud. cerc. Inframicrobiol., **16**, *4*, 323—329.

GRUIA M., BRĂNESCU L., (1965) *The plaque-forming character of certain ECHO virus strains*, Rev. roum. Inframicrobiol., **2**, *4*, 309—312.

GULEVICI N. E., VORONINA F. V., HESIN I. E. (1980), *Vostanovlenia ciuvstvitelnosti cletoc rezistentnih c virusu Coxsackie B3 pri obrabotche ih filtratom ciuvstvitelnosti cletoc*, Vopr. Virusol., 2, 241—244.

HAGIWARA A., TAGAYA I., YONEYAMA T. (1978), *Common antigen between Coxsackie virus A16 and enterovirus 71 (E71)*, Microbiol. Immunol., **22**, *2*, 81—88.

HAGUE M. L., PAGUE R. E., GAUNTT C. Y. (1980), *Studies of Coxsackie virus B3 in cultures of murine cardiac endothelial cells and myocytes.* În : Abst. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C. p. 264.

HALSTED C. C., SETO D. S. Y., SIMKINS J., CARVER D. (1970), *Protection of Enteroviruses against heat inactivation by sulfhydryl-reducing substances,* Virology, **40**, *3*, 751—754.

HAMMOND J. B., ROSENBERG J. L. (1972), *Stimulation of small intestinal mucosal enzymes during Coxsackie virus infection in neonatal mice,* J. lab. Clin. Med., **79**, *5*, 814—823.

HARB J. M., BURCH G. E. (1975), *Spherical aggregates of Coxsackie B4 virus particles in mouse pancreas,* Beitr. Pathol., **156**, *2*, 122—127.

HARFORD C. G., MIDDELKAMP J. N., FOX J., REED C. A. (1970), *Human diploid cell cultures in diagnosis of Echovirus 30 meningitis,* Arch. intern. Med., **125**, *5*, 864—866.

HASEGAWA A., INDUYE S. (1978), *Antigenicity and polipeptide composition of native and heated Echovirus type 7 procapsids,* J. gen. Virol., **42**, *1*, 119—125.

HATCH M. H., MARCHETT G. E. A. (1971), *Isolation of ECHO viruses with human embryonic lung fibroblast cells,* Appl. Microbiol., **22**, *4*, 736—737.

HECKER W., MEYER J., BOGNIREGUL A., BIENZ K. (1974), *Pinocytotic uptake and intralysosomal crystal formation of Coxsackie virus A9 in monkey kidney cells. An electronmicroscopic autoradiographic study.* Arch. Des. Virusforsch., **46**, *1—2*, 167—174.

HESIN I. E., AMCENKOVA A. M., GULEVICI N. E., NAROVLEANSKII A. N. (1978), *Sviazi hromosom grupî G v ceastnosti 21-ii hromosomî s ciuvstvitelnostiu celovecescchih cletoc c virusam Coxsackie B,* Bul. exp. Biol. Med., **86**, *11*, 577—579.

HOZINSKII V. V., VASILIEVA I. G., SEMENOV B. F., DROZDOV S. G. (1978), *Ghipercius-tvitelnosti zamedlenogo tipa pri experimentalnoi infecţii.* Vopr. Virusol., *4*, 474—475.

IAVOROVSKAIA V. S., BALANDINA A. M., GHICEVA T. A. (1972), *Izucenie nektorîh ghencticeschih priznacov virusov Coxsackie A13 i A18 firculiruiuscih v estestvenîh usloviah; izucenia activnosti reproducţii i termorezistentnosti,* Vopr. Virosol., **17**, *4*, 480—482.

IONESCU-MIHĂIEŞTI şi colab. (1954), *Izolarea virusului Coxsackie din fecalele unui copil suspect de poliomielită.* Com. Acad. R.P.R., **4**, *9—10*, 537—544.

YORDY A., HOFF-JORGENSEN R., FLAGSTAD A., LUND E. (1975), *Virus inactivation by ethylene oxide containing gases,* Acta vet. scand., **16**, *3*, 379—389.

JABLONSCHI L. (1971), *The effect of temperature on the variability of ECHO 9 (HILL) virus: description of mutants,* Acta virol., **15**, *1*, 28—34.

JACOB R., KHATI B., CHASON L., SILBERBERG B. K., LERNER A. M. (1980), *Age-dependent pathogenity group B Coxsackie virus in Swiss-Webster mice: infectivity for myocardium and pancreas,* J. infect. Dis., **141**, *3*, 394—403.

JAMISON R. M. (1974), *An electromicroscopic study of the intracellular development of ECHO-virus 22,* Arch. Ges. Virusforsch., **44**, *3*, 184—194.

JARVIS D. L., SENA I. (1980), *Effect of ultraviolet irradiation on poliovirus.* În : Abst. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., p. 258.

KABIRI M., BASIRI E., KADIVAR D. (1978), *Potentiation of Coxsackie-virus B3 infection in adult mice pretreated with a gold salt,* J. med. Virol., **3**, *2*, 125—136.

KAPRELIAN G., TZEKOVA F., GORDEVSKA V., TCHILIAN M., ROUSEV V. (1980), *Virus cultivés sur le tissu de la glande thyroïde,* Arch. Union méd. Balk., **18**, *1*, 115—117.

KAWAMOTO H. (1980), *An application of factor analytics on antigenic drift and chromatographic analysis on intratypic variation of enterovirus type 70* Jap. J. med. Sci. Biol., **33**, *3*, 155—165.

KAWANISHI M. (1978), *Intranuclear crystal formation in Picornavirus infected cells,* Arch. Virol. **57**, *2*, 123—132.

KIBRICK S., LORIA R. M. (1977), *Enteric resistance and Coxsackie virus B,* Amer. J. clin. Nutr., **30**, *11*, 1871—1875.

KLÖCKING R., SCHWEIZER H., SPROSSIG M. (1974a), *Freisetzung zellulärer Enzyme während der Vermehrung von Coxsackie virus A9 in Fl-Zellen. I. Freisetzung von Lactatdehydrogenase, Alaninaminotransferase, Asparataminotransferase und Fructose diphosphataldolase,* Arch. Ges. Virusforsch., **44**, *2*, 102—108.

KLÖCKING R., SCHWEIZER H., STRÖSSIG M. (1974b), *Freisetzung zellulärer Enzyme während der Vermehrung von Coxsackie A9 in FL-Zellen. II. Abhängigkeit der Enzymfreistzung von Zelldite, Viruskonzentration, pH wert und Serumgehalt des Incubationsemediums,* Arch. Ges. Virusforsch., **46**, *3—4*, 353—359.

KOGUT E. P., BOGACI V. V., JERDEVA A. I. (1978), *Modelarea infecţiei cu Coxsackie A pe şobolani adulţi,* Vopr. Virusol., *3*, 342.

Scanned with OKEN Scanner

SIROBOKOV V. P. (1978), *Heterogeneity of enterovirus population by bentonite marker and its connection with other genetic characters.* În : Vol. Rez. Al VII-lea Congr. Intern. Boli Infect. Parazit., 2—3 oct., Varna, p. 208.

SODA K. (1971), *Plaque characteristics of Coxsackie A 7 virus.* Jap J. med. Sci. Biol., **24**, *5*, 295—311.

STEFANESCO V., MIHAILESCO R., GAICO N., DINCULESCO M. (1969), *Essais de déterminer l'état d'interférence entre les virus entériques et les virus de la vaccine*, Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **28**, *1*, 137—143.

SUBRAHMANYAN T. P., LESIAK J. M., LABZOFFSKY N. A. (1973), *A new intratypic variant of Coxsackie B6 virus*, Arch. ges. Virusforsh., **41**, *4*, 360—364.

SULLIVAN R., SCARPINO P. V., FASSOLITIS A. C., LARKIN E. P., PEELER J. T. (1973), *Gamma radiation inactivation of Coxsackie virus B-2*, Appl. Microbiol., **26**, *1*, 14—17.

TENNO K. M., FUJIOKA R. S., LOH P. C. (1980), *The mechanism of chloramine inactivation of polio virus*, Abst. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington D. C., p. 211.

TIMOFEEVA M. M., VOTIAKOV V. I., BRUSKOV I. V., ANDREEVA O. T. (1977), *Haracteristica deistvia novogo protivirusnogo vescesta iz riada 3-oksipiperidona-4 na kişecintie virust.* În : Vol. Congr. III. Respubl. Epidem. Microbiol., Infectii. ighenistov, Tallin, p. 190—191.

TONEW M., TONEW E. (1980), *Inhibitory activity of 2-amino-oxazole derivatives against Coxsackie B1 virus in FL cells*, Acta virol., **24**, *3*, 207—214.

TOTSUKA A., OHTAKI K., TAGAYA (1978), *Aggregation of enterovirus small plaque variants and poliovirus under low ionic strength conditions*, J. gen. Virol., **38**, *3*, 519—533.

TRANT C. M., JAMISON R. M. (1975), *Electron microscopic study of the morphogenesis of Echovirus 23*, Exp. Mol. Pathol., **22**, *1*, 55—64.

TSURUHARA T., MUKOYAMA A., HAGIWARA A. (1981), *Intracytoplasmic crystals of enterovirus 71 in cultured cells*, J. electron. Microb., **30**, *1*, 67—68.

UESUGI K. (1972), *Pathogenesis for mice of Coxsackie A virus type 16*, Jap. J. exp. Med., **42**, *4*, 315—326.

VOICULESCU C. (1966), *Difference of the appearance of resistance to infection with Coxsackie A 5 virus strains of various origin in weaned mice*, Arch. roum. Path. exp. Microbiol. **25**, *3*, 711—718.

VOICULESCU C., DINULESCO M., EPURAN E. (1969 Y.), *Pouvoir pathogène et immunogène des souches de virus Coxsackie A10 propagées dans les cultures tissulaires*, Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **28**, *1*, 177—188 ; *2—3*, 629—639.

VOICULESCU C., STANCIU L., ROGOZ S., BLAJ-BLAJEU S., TOMESCU R., TATULESCU M. (1980), *Studiul asupra infecției cu virus Coxsackie, A10 a șoarecilor de prima vîrstă din tulpinile* A_2G, ICR—K și CBA, Bact. virusol. parazitol. epidemiol., **25**, *1*, 35—43.

YOSHII T., KOHO R. (1978), *Optimal conditions for plaque assay of ECHO viruses in human embryonic lung fibroblast cells*, Jap. J. med. Sci. Biol., **31**, *1*, 87—90.

WARD R. L. (1980), *Mechanisms of poliovirus inactivation by the direct and indirect effects of ionizing radiation*, Radiol. Res., **83**, *2*, 330—344.

WOODRUFF J. F., WOODRUFF J. J. (1971), *Modification of severe Coxsackievirus B3 infection in marasmic mice by transfer of immune lymphois cells*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **68**, *9*, 2108—2112.

ZAVATE O., IVAN A. (1967), *Imunoglobulinele și utilizarea lor în profilaxia și tratamentul bolilor infecțioase (Partea II). Utilizarea lor în bolile virale*, Rev. med.-chir. Iași, **71**, *2*, 279—287.

ZAVATE (1970), *Stadiul actual al vaccinării antipoliomielitice*, Rev. med. chir. Iași, **74**, *2*, 281—287.

ZEIPEL G. (1980) *Most ECHO viruses reach higher titers in R. D. than in GMK-AH 1 cells. Regardless of their passage history*, Arch. Virol., **63**, *2*, 143—146.

ZEMLIANSKII V. V. (1978), *Vozmojnîie mehanizmi naccalnîh izmenenii membrannogo potentiala eletok pri uzaimodestvii s enterovirusami*, Microbiol. J., **40**, *5*, 619—622.

ZILKA E., RANGELOVA S., TODOROV S. L., KAVAKLOVA I., PRASKOV D., DANEVA M. (1978a), *Radiometric studies of DNA, RNA and proteinkinetics in cell cultures inoculated with Coxsackie B4 virus*, Probl. Infect. Parasit. Dis., *5*, 7—11.

ZILKA E., RANGELOVA S., KAVAKLOVA L., TODOROVA S., PRASKOV D., DANEVA M. (1978b), *Double infection of FL cells with virus herpes simplex and Coxsackie B4. 1. A study of double infection with a preliminary inoculation of herpes virus*, Probl. Infect Parasit. Dis., *5*, 57—64.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 3

EPIDEMIOLOGIA, PATOGENIA ŞI CLINICA INFECŢIILOR DETERMINATE DE ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE

Avînd în vedere bogăţia informaţiilor bibliografice referitoare la problema epidemiologiei, patogeniei şi a manifestărilor clinice a enterovirozelor, în materialul de faţă, cu excepţia literaturii româneşti, ne vom referi în special la articolele apărute în ultimii 5—7 ani, pentru o informare mai detaliată fiind recomandate cîteva rapoarte asupra acestor probleme (Nicolas şi Huraux, 1976; Voroşilova, 1977; Grist şi colab., 1978; Melnick şi Rennick, 1980).

3.1. EPIDEMIOLOGIE

3.1.1. RĂSPÎNDIREA INFECŢIEI

Prezenţa ubicuitară a enterovirusurilor în masa populaţiei aparent sănătoase constituie astăzi o noţiune bine stabilită şi demonstrată prin ample cercetări din ţară şi din străinătate. Investigaţiile privind circulaţia enterovirusurilor, însă, îşi păstrează mereu actualitatea deoarece pe de o parte ele reflectă potenţialul patogen al acestor virusuri pe un anumit teritoriu într-o anumită perioadă de timp iar, pe de altă parte, ele au devenit un corolar indispensabil pentru stabilirea calendarului de vaccinare antipoliomielitică.

Pentru cunoaşterea potenţialului epidemiologic al enterovirozelor se preconizează două categorii de studii: studii virusologice asupra frecvenţei excretorilor de enterovirusuri şi studii serologice care permit să se stabilească frecvenţa posesorilor de anticorpi ca rezultat al contactului de-a lungul timpului cu diferite tipuri antigenice de enterovirusuri.

Studiile virusologice se pot realiza prin examenul materiilor fecale provenite de la diferite grupe reprezentative de populaţie. Pe de altă parte, avînd în vedere dificultăţile de a se efectua un volum mare de examene virusologice pe materii fecale, în vederea aprecierii circulaţiei enterovirusurilor în masa populaţiei, s-a propus examinarea apelor de canal care permite izolarea enterovirusurilor din materii fecale provenite de la grupuri mari de populaţie. Compararea rezultatelor din aceste două categorii de investigaţii a arătat o concordanţă satisfăcătoare, detalii asupra acestui subiect urmînd a fi expuse în capitolul 5.

Rezultatele investigaţiilor virusologice asupra tipurilor antigenice de enterovirusuri în relaţie cu manifestările clinice pe care le determină sînt publicate periodic de către O. M. S. în rapoarte bazate pe cumularea

Scanned with OKEN Scanner

rezultatelor unui număr de peste 100 de laboratoare din diferite țări de pe glob (Assaad și Cockburn, 1972; Grist și colab., 1978).

S-a ajuns la concluzia că infecțiile enterovirale sînt larg răspîndite pe întregul glob, zone lipsite de enterovirusuri fiind practic inexistente. Circulația enterovirusurilor este mult mai mare decît cea care se reflectă prin studiul morbidității, fenomenul „aisberg" fiind bine cunoscut atît în poliomielită cît și în enterovirozele nepoliomielitice (Teodorovici, 1978). Astfel, se apreciază că la un caz paralitic de poliomielită numărul de persoane infectate este de 300 pentru tipul 1, de 1 500 pentru tipul 3 și de 10 000 pentru tipul 2 de poliovirus (Gaudin, 1964). Pentru virusurile nepoliomielitice raportul dintre formele aparente și cele inaparente pare să fie asemănător, cu variații de la un tip antigenic la altul.

Frecvența excretorilor de enterovirusuri în masa populației aparent sănătoase a variat între 0,5 și 80% din totalul persoanelor examinate, proporțiile înregistrate oscilînd de la un an la altul în raport cu zona geografică, vîrsta, sezonul etc. După introducerea vaccinărilor antipoliomielitice orale s-a presupus că întreruperea circulației virusului poliomielitic sălbatic ar putea duce la creșterea morbidității prin alte virusuri enterice, tulburarea balanței ecologice constituind riscul oricărui program de eradicare. Totuși, o asemenea consecință nu a fost demonstrată în mod net pentru enterovirusuri.

Ionescu-Mihăiești și colab. (1963), Ciupe și Ionescu (1968) și Zavate și colab. (1969) au constatat că, în perioada vaccinărilor antipoliomielitice cu vaccin viu atenuat, circulația enterovirusurilor nepoliomielitice nu a fost influențată în mod evident. Studii asupra circulației enterovirusurilor în zona București au fost efectuate de Predescu și colab. (1964) și de Solomon și colab. (1968). În Moldova, Zavate și colab. (1971a; 1973a) au înregistrat o proporție de 14,8% purtători printre copiii din mediul urban și de numai 7,2% pentru cei din mediul rural, iar Galaction și colab. (1972) proporția de 37,9% purtători în mediul rural printre copiii din familii cercetate în dinamică de-a lungul unui an. În sfîrșit, așa cum am arătat, date suplimentare asupra gradului de răspîndire a infecțiilor enterovirale mai sînt furnizate de studii serologice, aspect care va fi detaliat în continuare.

3.1.2. PROCESUL EPIDEMIOLOGIC

Sursa de infecție și căi de transmitere. Sursa principală de infecție în enteroviroze este reprezentată de către omul bolnav cu formă aparentă sau inaparentă la care durata de excreție variază de la un grup de enterovirusuri la altul, putînd depăși uneori 50 de zile. Virusul se elimină prin secreții faringiene dar, în special, prin materii fecale. Transmiterea infecției de la excretor la omul receptiv se face cel mai adesea prin contact direct, pe cale fecal-orală, prin mîini murdare sau prin secreții aerosolizate nazofaringiene. Rolul apei, al alimentelor și al solului în transmiterea enterovirusurilor nu este deloc neglijabil, așa cum vom arăta în detaliu în capitolul 5. Melnick și Rennick (1980) au arătat că printr-un gram de materii fecale se elimină o cantitate de virus Coxsackie sau ECHO de $10^5 - 10^8$. Aceasta înseamnă că pe un volum de aproximativ 100 g fecale eliminate pe zi se disemnează între 10 și 300 de milioane de DCP_{50} virus. Această cantitate enormă de virus la care se adaugă și durata rela-

tiv mare de eliminare determină o contagiozitate ridicată a infecţiei chiar dacă aceasta se manifestă rar prin forme clinice aparente.

În ceea ce priveşte animalele ca rezervor de virus, se poate menţiona că prezenţa enterovirusurilor sau a anticorpilor faţă de acestea au fost pusă în evidenţă la unele animale domestice (viţei, cîini, cai, capre, porci, pisici), la unele animale sălbatice (maimuţe, rozătoare, veverițe, vulpi) şi chiar la insecte (Lundgren şi colab., 1970; Maguire, 1970; Kiseleva şi colab., 1972; Voroşilova, 1977; Chandy şi colab., 1980; Wellings şi colab., 1980). În privinţa anticorpilor, menţionăm că este dificil de stabilit dacă aceştia au fost induşi ca urmare a unor infecţii oculte cu virus uman sau dacă sînt rezultatul unor reacţii de neutralizare încrucişată cu unele virusuri sau chiar bacterii de origine animală (Grew şi colab., 1970; Gaudin, 1964). Rolul muştelor în transmiterea infecţiei a fost dovedit în condiţii naturale şi experimentale dar nu s-a putut demonstra multiplicarea enterovirusurilor în organismul acestor insecte. În ţara noastră, Duca şi colab. (1958) au demonstrat experimental că musca domestică elimină virusul timp de 16 zile după prînzul infectat. Nu s-a putut transmite infecţia prin ou la generaţiile următoare. Gîndacii de bucătărie (*Periplaneta americana*) infectaţii cu virusul Coxsackie A4 au prezentat virusul pînă la 20 de zile de la prînzul infectant.

Receptivitatea. Receptivitatea faţă de infecţia enterovirală aparentă sau inaparentă este generală. Infecţia cu un tip antigenic de enterovirus lasă o imunitate durabilă faţă de tipul respectiv, contaminările succesive ale copiilor încă din primii ani de viaţă ducînd la o imunizare treptată a masei populaţiei care devine rezistentă faţă de numeroase tipuri antigenice la vîrsta adultă. Aprecierea receptivităţii şi, totodată, a gradului de răspîndire a enterovirusurilor, se poate realiza prin cercetarea în masa populaţiei de diferite grupe de vîrstă a amprentei imunologice faţă de diferite tipuri antigenice. În ultimii 10 ani, studii asupra prezenţei de anticorpi la diferite grupe de populaţie s-au efectuat pentru unul sau mai multe tipuri antigenice în India (Agarwal şi colab., 1973), Japonia (Sato şi colab., 1972), Italia (Zeppa, 1971), R.D. Germană (Böthig şi colab., 1979). În U.R.S.S., Venedictova şi colab. (1975) au arătat că toate seriile de gamaglobuline standard cercetate au prezentat anticorpi faţă de virusurile Coxsackie A13, 18 şi B3 (luate ca indicator), titrul acestora fiind variabil de la o zonă geografică la alta.

În toate aceste studii s-a relevat frecvenţa crescută a posesorilor de anticorpi, în special printre adulţi, ceea ce reflectă rezistenţa masei populaţiei din această grupă de vîrsta la infecţie. Astfel, într-un studiu, 76% dintre persoanele cercetate au fost posesori de anticorpi pentru virusuri din grupul Coxsackie şi 43% pentru diferite tipuri antigenice de ECHO. Reinfectarea cu tipul antigenic omolog a fost întîlnită uneori în cazul virusurilor Coxsackie şi rar pentru virusurile ECHO (Grist şi colab., 1978).

În ţara nostră, Reichart şi colab. (1957) cu ocazia studiilor serologice din focare de poliomielită au semnalat frecvenţa anticorpilor anti-Coxsackie printre persoanele sănătoase din zona Timişoara. Gruia şi colab. (1960) au înregistrat proporţii de 63,3%, 36,6% şi 31,0% posesori de anticorpi anti-ECHO tip 7, 9 şi, respectiv, 19 printre 385 de persoane adulte din zona Bucureşti.

În anul 1968, Arion şi colab. au cercetat prezenţa de anticorpi neutralizanţi faţă de virusurile Coxsackie B1—6 şi A1—5 la 148 de per-

Scanned with OKEN Scanner

soane din 5 zone ale ţării constatînd că peste jumătate din populaţie posedă anticorpi faţă de unele virusuri Coxsackie circulante în masa populaţiei în anii anteriori (B4, A5, A4, B3). În acelaşi an, Solomon şi colab. (1968) au semnalat la rîndul lor că aproximativ 2/3 din populaţie din zona Bucureşti posedă anticorpi faţă de virusurile ECHO tip 3, 6, 7, 11 şi 19 (cercetate), ceea ce reflectă o circulaţie intensă a acestor virusuri în teritoriu.

Factorii social-economici. Nivelul socioeconomic al colectivităţilor umane joacă un rol deosebit în ceea ce priveşte gradul de răspîndire a infecţiei. Primul contact cu agentul patogen se face cu atît mai precoce cu cît condiţiile de igienă sînt mai precare favorizînd transmiterea fecal-orală ocultă. Ca urmare, în colectivităţile umane cu un nivel socioeconomic mai înalt morbiditatea va fi mai crescută şi va afecta grupe de vîrstă mai mari.

După Voroşilova (1977), această explicaţie nu este întru totul satisfăcătoare. Autoarea consideră că în natură există o evoluţie a caracterelor unor tulpini de enterovirusuri care pot deveni virulente determinînd îmbolnăviri în masa populaţiei.

Vîrsta. Studii longitudinale au arătat că infecţiile enterovirale sînt larg răspîndite printre copiii din familii, incidenţa maximă înregistrîndu-se sub vîrsta de 5 ani. Majoritatea acestor infecţii sînt asimptomatice iar dintre cele clinic manifeste predomină afecţiunile tractului respirator (Suzuki şi colab., 1980). Adulţii sînt în general protejaţi prin anticorpi dobîndiţi de-a lungul timpului. Printre copiii din colectivităţi infecţia este şi mai larg răspîndită în comparaţie cu cei din familii. Colectivităţile de sugari constituie un mediu extrem de favorabil pentru diseminarea enterovirusurilor. Gravitatea infecţiilor la nou-născuţi contrastează cu benignitatea cazurilor la copiii mari.

În colectivităţi cu copii mai mari, incidenţa excretorilor, cu sau fără boală, a variat între 10 şi 40% din totalul copiilor investigaţi: (Abraham şi Cheever, 1979; Brisou şi colab., 1982).

La noi în ţară, s-a arătat că raportul între incidenţa copiilor purtători de enterovirusuri în familie şi a celor din colectivitate a fost de 1/4, datele obţinute la ultimii fiind, în condiţiile noastre epidemiologice, considerate mai semnificative pentru întreaga populaţie infantilă (Ciugarin şi colab., 1968; Ciupe şi Ionescu, 1968). În Bucureşti, investigaţiile efectuate de către Solomon şi colab. (1968) printre 263 de copii aparent sănătoşi au relevat o frecvenţă de 16,3% purtători de enterovirusuri.

În zona Moldovei, Avram şi colab. (1971) au efectuat investigaţii în dinamică la 206 copii din mediul urban dintre care 71 copii de 0—3 ani dintr-o creşă, 79 copii între 4 şi 6 ani dintr-o grădiniţă şi 56 de copii între 7 şi 10 ani dintr-o şcoală elementară, toate din acelaşi cartier. Autorii au scos în evidenţă că în decursul anului, din totalul celor 206 copii, 38,2% au prezentat enterovirusuri în intestin cel puţin odată, proporţia de purtători variind de la 19,2%, printre copiii la care s-a efectuat un singur examen, pînă la 61,9% printre cei cu mai mult de 7 examene pe an, de unde reiese intensitatea circulaţiei enterovirusurilor în masa populaţiei infantile aparent sănătoase şi necesitatea investigaţiilor periodice pentru aprecierea reală a potenţialului epidemiologic al enterovirusurilor în colectivităţi (tabelul 3.1).

Analizînd particularităţile circulaţiei enterovirusurilor comparativ în cele trei colectivităţi, s-au constatat diferenţe marcate atît din punctul

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.1

Frecvența excretorilor de enterovirusuri printre copiii dintr-o colectivitate deschisă, în raport cu numărul examenelor pe an

Nr. examene pe an	Nr. copii examinați	Număr de copii purtători de enterovirusuri						
		Nr. de investigații					Total	
		1	2	3	4	5	Nr. copii	%
1	47	9	—	—	—	—	9	19,2
2	37	4	1	—	—	—	5	13,5
3	39	11	4	—	—	—	15	38,5
4	22	7	1	—	1	—	9	40,9
5	22	8	3	3	—	—	14	63,6
6	18	6	3	3	—	1	13	72,2
7+	21	7	5	—	—	1	13	61,9
Total	206	52	17	6	1	2	78	38,2

de vedere al frecvenței excretorilor cît și a numărului de serotipuri circulante, imprimate de vîrsta diferită a copiilor examinați (tabelul 3.2).

Tabelul 3.2

Frecvența purtătorilor de enterovirusuri și numărul de tipuri antigenice circulante, comparativ în trei colectivități de copii

Colectivitate	Vîrsta (ani)	Nr. copii investigați	Purtători de entero-virusuri pe an (%)	Nr. tipuri antigenice circulante
Creșă	0—3	71	69,0	15
Grădiniță	4—6	79	27,8	9
Școală	7—10	56	12,5	4

În situații epidemice, grupele de vîrstă afectate au fost diferite de la o epidemie la alta, așa cum reiese din figura 3.1.

În ceea ce privește sexul, cu toate cu incidența excretorilor este aceeași la băieți și la fete, totuși indicele de morbiditate prin paralizii, meningite etc. a fost găsit mai crescut la băieți (Gaudin, 1964). Se consideră că aceasta se datorează unei expuneri mai prelungite și mai masive la contaminare, părinții considerînd că băieții pot să fie tratați în mod mai deosebit decît fetele, permițîndu-li-se să se joace în condiții mai favorabile contaminării pe cale digestivă.

Sezonul. Aspectul sezonier al infecțiilor enterovirale este bine conturat, incidența izolărilor atît în masa populației aparent sănătoase cît și la bolnavi fiind maximă în sezonul iunie-septembrie pentru emisfera nordică și noiembrie-februarie pentru cea sudică așa cum reiese din figura 3.2 în care sînt transpuse în grafic cifrele publicate de Assaad și Cockburn (1972).

Scanned with OKEN Scanner

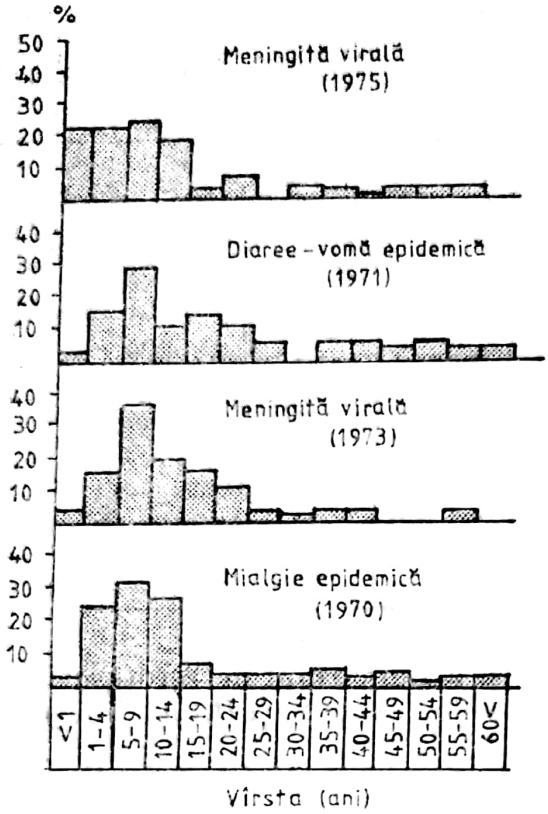


Fig. 3.1. — Repartiţia pe grupe de vîrstă a îmbolnăvirilor în focare determinate de enterovirusuri nepoliomielitice în Moldova

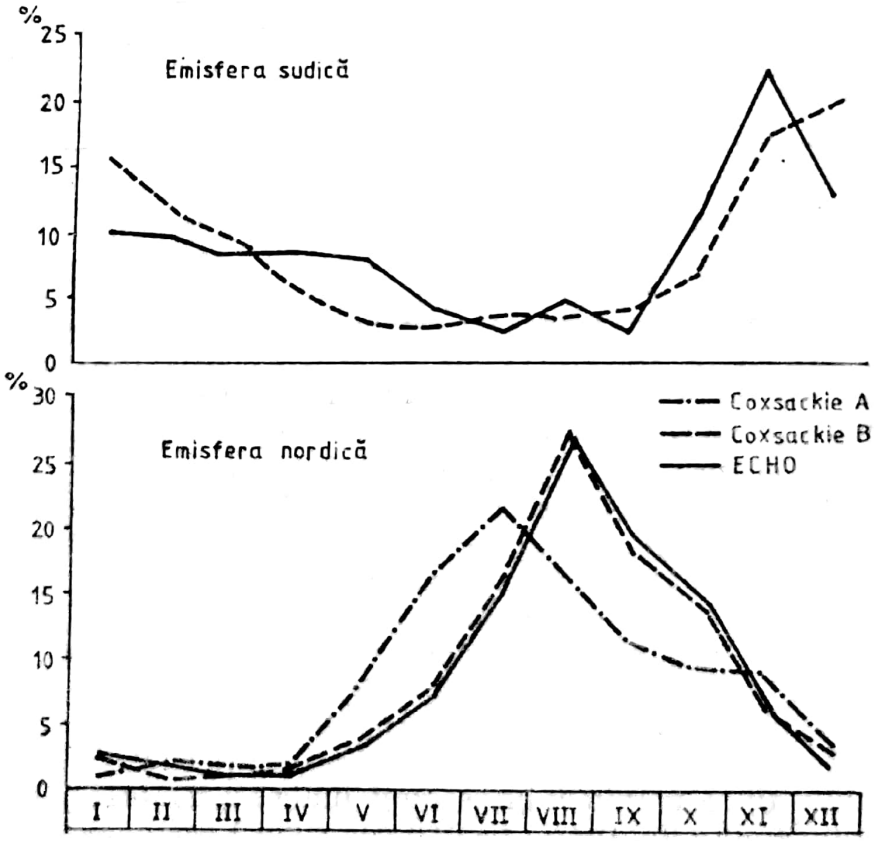


Fig. 3.2. — Incidenţa lunară a infecţiilor cu enterovirusuri nepoliomielitice după date O.M.S.

Scanned with OKEN Scanner

În ţara noastră, incidenţa maximă a excretorilor de enterovirusuri a fost înregistrată în lunile de vară-toamnă. De exemplu, în zona Moldovei (Zavate şi colab., 1973a), maximum de izolări de enterovirusuri nepoliomielitice s-a înregistrat în trimestrul II (27,3 %), iar minimum în trimestrul I al anului (4,0 %) (fig. 3.3).

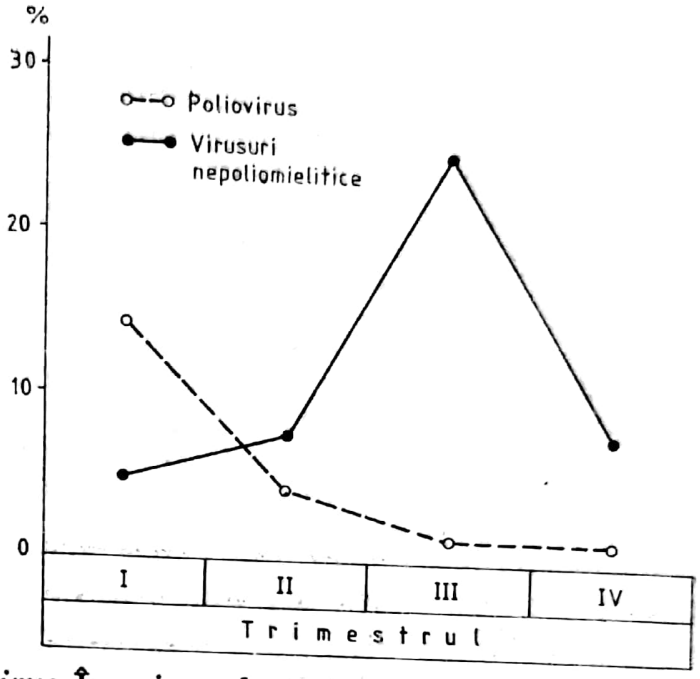


Fig. 3.3. — Incidenţa trimestrială a izolărilor de enterovirusuri în Moldova (după Zavate şi colab., 1973)

Tipul antigenic de enterovirus. În orice colectivitate umană se constată circulaţia concomitentă a mai multor tipuri antigenice de enterovirusuri. Acest fenomen este sugestiv ilustrat de investigaţiile în dinamică efectuate în ţara noastră de Avram şi colab.(1971) care au demonstrat că de-a lungul aceluiaşi an unii copii pot să fie infectaţi cu 2, 3 şi chiar mai multe tipuri antigenice de enterovirusuri. Aşa cum reiese din exemplele din tabelul 3.3,

Tabelul 3.3

Dinamica contaminării cu diferite tipuri antigenice de enterovirusuri la unii copii din colectivităţi

Nr. crt.	Nr. recolte/an	Luna recoltării probelor de materii fecale											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
4	12	0	0	P1	E9	0	B5	B5	0	A	0	0	0
10	5	0	—	—	—	—	0	B5	0	—	A	—	0
18	7	0	B2	—	P2	—	0	—	—	0	—	0	0
19	8	0	—	—	—	0	E4	0	B2	0	0	—	0
20	6	A	—	0	E9	0	—	B5	—	0	—	—	—
111	5	—	0	P3	—	0	E11	—	—	—	—	—	0
112	7	—	0	P3	0	0	B5	—	—	B2	0	—	—
106	3	—	—	E18	—	—	0	B5	—	—	—	—	—
108	4	—	—	P2	A9	—	0	—	—	—	0	—	—
109	6	—	—	E4	0	0	E4	A	—	—	—	0	—
113	7	—	—	A9	E19	P1	—	B5	B2	0	—	—	0
115	6	—	—	0	—	0	B5	—	B2	E18	—	0	—
131	7	—	—	—	0	0	A9	B5	—	0	—	0	—
132	5	—	—	—	E4	—	E7	—	B2	P3	—	0	—
133	7	—	—	—	—	A9	0	P3	0	0	0	—	0

0 = rezultate negative
L = retestat
P = poliovirus

A = Coxsackie A
B = Coxsackie B
E = virus ECHO

Scanned with OKEN Scanner

s-a constatat că înlocuirea unui tip serologic cu altul s-a produs la unii copii relativ repede, de la o recoltă la alta, adică sub 30 de zile (ex. copiii nr. 4, 113, 115, 132 etc.); în alte situaţii durata stării de purtător pentru acelaşi tip antigenic a fost de 2, 3 sau chiar 4 luni (copiii nr. 4, 18 şi 109), aspecte semnalate şi de alţi cercetători (Abraham şi Cheever, 1979).

În diferite zone geografice, în anumiţi ani unele tipuri antigenice devin „active" pentru ca apoi frecvenţa lor să se reducă şi să apară altele. S-a semnalat că reapariţia tipurilor antigenice de enterovirusuri se produce la un interval de 2—4 ani, evoluţia ciclică datorîndu-se acumulării unei mase receptive de populaţie şi poate şi altor factori necunoscuţi încă (Böthig şi Starke, 1978; Jdanovskaia şi colab., 1981).

Se consideră că virusurile Coxsackie sînt mai transmisibile în comparaţie cu virusurile ECHO, proporţia copiilor contacţi familiali susceptibili de a face infecţia fiind, după Fenner şi White (1976), de 76% şi, respectiv, 43%.

Într-o perioadă de 8 ani (1967—1974) tipurile antigenice de enterovirusuri cel mai frecvent raportate în diferite zone ale globului în cadrul unui studiu colaborativ O.M.S. (Grist şi colab., 1978) au fost virusurile Coxsackie A9 şi 16, B5 şi 3 şi ECHO tip 9, 6, 11 şi 30. Virusurile din grupul Coxsackie A au fost izolate cel mai frecvent de la pacienţi cu afecţiuni eruptive (în special boala mînă-picior-gură, la copii sub 5 ani), în meningita aseptică şi în afecţiuni respiratorii. Virusurile Coxsackie grup B au fost găsite de cele mai multe ori în meningita aseptică, boli respiratorii, boala Bornholm şi în boli cardiace la pacienţi peste 15 ani. În sfîrşit, infecţiile cu virusuri ECHO au fost cel mai frecvent identificate în cazurile de meningită aseptică iar erupţiile pielii au fost asociate cu virusurile ECHO tip 9, 16 şi 18.

În zona Moldovei, Zavate şi colab. (1973) au pus în evidenţă o largă gamă de tipuri antigenice de enterovirusuri circulante în masa populaţiei: 17 tipuri de virusuri ECHO cu predominanţa tipurilor 1 şi 11 la bolnavi şi a tipurilor 7 şi 12 la persoane aparent sănătoase şi 13 tipuri serologice de Coxsackie cu predominanţa tipurilor B2 şi B5 la copii sănătoşi şi B1 şi B3 în focare epidemice (fig. 3.4).

Forme de manifestare ale procesului epidemiologic. Infecţiile enterovirale nepoliomielitice, ca şi cele poliomielitice, pot evolua sub formă sporadică, endemică sau endemoepidemică. Au fost descrise focare familiale, de locuinţă precum şi focare de colectivitate (colectivităţi închise de copii, internate, tabere de vară etc.). În focarele familiale cazul primar, de contaminare extrafamilială, este urmat de cazuri secundare de contaminare intrafamilială la intervale de timp corespunzătoare perioadei de incubaţie (Teodorovici, 1978). S-a putut determina succesiunea infecţiilor aparente sau inaparente în familii şi grupuri de case la intervale de timp relativ mari (30-40 zile), ceea ce arată o răspîndire lentă şi persistenţa îndelungată a virusului în focar.

În unele situaţii, aşa cum vom arăta în capitolul 3.3.8, enterovirozele s-au manifestat ca infecţii nosocomiale, diseminarea în mediul spitalicesc fiind favorizată de rezistenţa agentului viral în mediul extern (Teodorovici şi Ivan, 1981). În general, însă, ponderea infecţiilor nosocomiale de origine enterovirală este modestă. În ţara noastră, Zavate şi colab. (1981) au efectuat, în trei etape, examene virusologice pe 1 431 de probe de materii fecale recoltate în sezonul de maximă circulaţie a enterovirusurilor (lunile iulie-septembrie a anilor 1971, 1972 şi 1973). Pacienţii proveneau din 11 secţii de spital dintre care 6 din mediul urban (4 de copii şi 2 de

adulţi) şi 5 din mediul rural (2 de copii şi 3 de adulţi). Rezultatele au arătat că proporţia excretorilor de enterovirusuri printre bolnavii din secţiile de copii (12,1%) a fost de aproximativ 10 ori mai crescută decît printre bolnavii din secţiile de adulţi (1,2%). Din totalul celor 137 de tulpini de enterovirusuri izolate, 102 (74,5%) au aparţinut virusurilor Coxsackie A şi

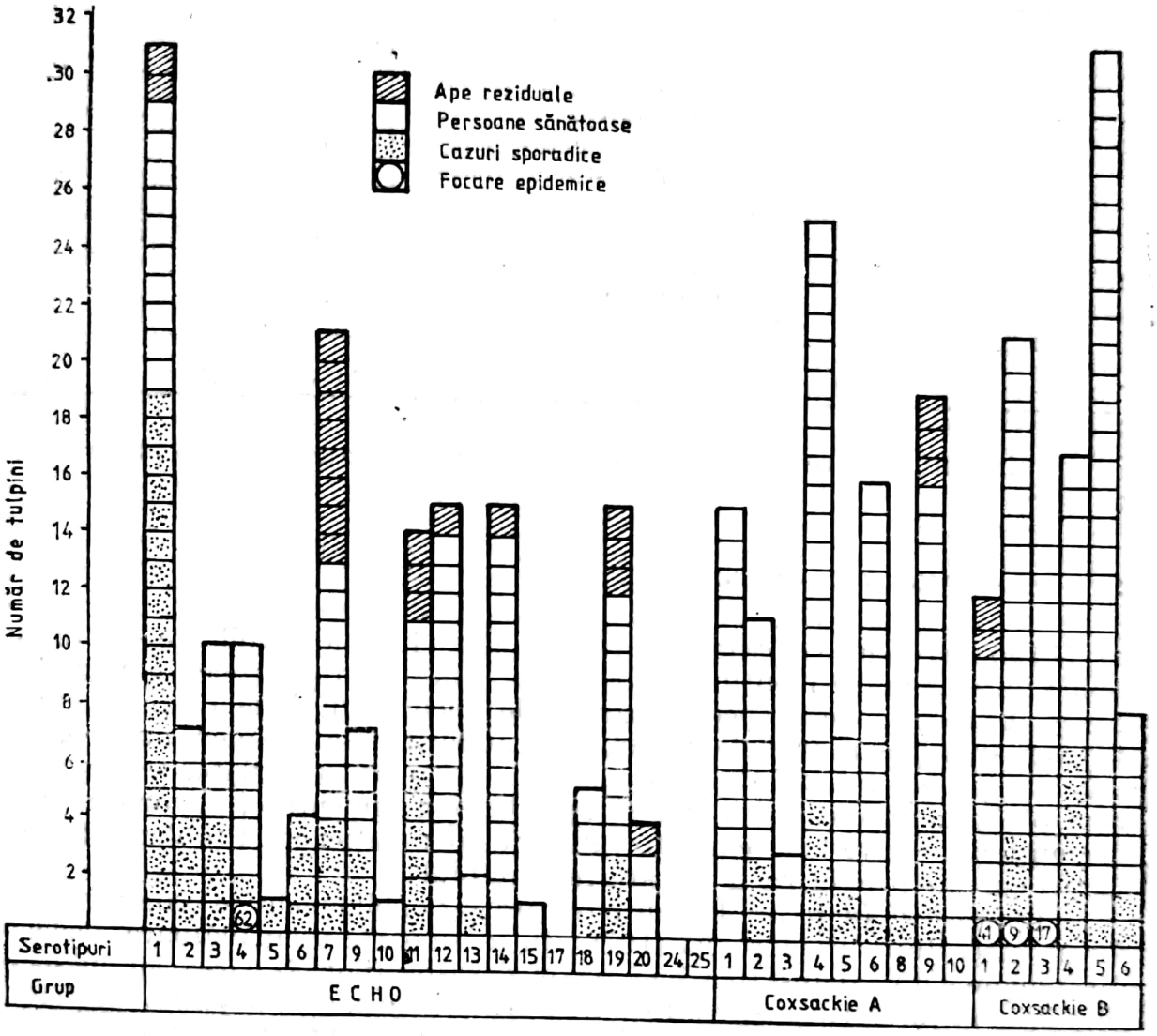


Fig. 3.4. — Tipurile antigenice de enterovirusuri nepoliomielitice circulante în Moldova (după Zavate şi colab., 1973a)

B şi 35 (25,6%) grupului de virusuri ECHO (tabelul 3.4). Incidenţa medie a excretorilor de enterovirusuri printre copii din secţiile spitalelor urbane (12,5%) a fost mai crescută decît cea din secţiile spitalelor rurale (8,2%), deşi condiţiile igienico-sanitare şi de funcţionalitate erau mai bune în prima categorie de secţii. Aceasta sugerează că proporţiile înregistrate reflectă de fapt incidenţa „normală" a purtătorilor din teritoriu fără ca mediul spitalicesc să contribuie în mod evident la diseminarea enterovirusurilor.

Aceleaşi concluzii au reieşit şi din investigaţiile efectuate în dinamică pe un lot de copii examinaţi virusologic săptămînal de la internarea şi pînă la externarea din spital, nefiind semnalate intercontaminări cu

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.4

Incidența excretorilor de enterovirusuri în mediu spitalicesc

Mediu	Grup vîrstă	Secție spital	Nr. pacienți	Excretori virusuri nepoliomielitice	
				nr.	%
URBAN	Copii	Clinică pediatrie	690	97	14,0
		Clinică boli infecțioase	245	18	7,3
		Secția pediatrie 1	56	7	12,5
		Secția pediatrie 2	10	3	(30,0)
	Adulți	Clinică boli cardiovasculare	94	1	1,1
		Clinica boli gastrointestinale	46	0	0
RURAL	Copii	Secția pediatrie	49	6	12,2
		Secția TBC-cronici	49	2	4,1
	Adulți	Boli interne	38	1	2,6
		Spital neuropsihici	83	0	0
		Sanatoriu TBC	71	2	2,8
TOTAL			1431	137	9,6

enterovirusuri printre cei 140 de pacienți din 4 saloane luate în observație timp de 2 luni.

3.1.3. PROFILAXIE ȘI COMBATERE

a) *Măsuri profilactice generale.* Măsurile tradiționale aplicate în toate bolile intestinale își mențin valabilitatea și în enterovirozele nepolimielitice. Astfel, se vor respecta regulile de igienă individuală, se va evita frecventarea locurilor aglomerate, a ștrandurilor sau băilor publice, se vor întreprinde măsuri de salubrizare a centrelor populate, se va face controlul curent al calității apei și a produselor alimentare, se vor practica dezmuștizări, se va face educație sanitară a populației etc. Problema dezinfecției corecte a apei va fi tratată în capitolul 5.

b) *Măsuri în focar.* În enterovirozele nepoliomielitice conduita în focare este, după Teodorovici (1978), în mare parte asemănătoare aceleia din poliomielită: depistarea bolnavilor și suspecților, izolarea lor în secțiile de boli infecțioase și confirmarea prin examene de laborator a diagnosticului clinic și epidemiologic, declararea cazurilor, supravegherea contacților pe perioade de maximă incubație, neutralizarea căilor de transmitere (spălat pe mîini, dezinfecția locuinței și a apei, dezmuștizare, igiena alimentelor etc.). Dat fiind rezistența mai mare a enterovirusurilor față de dezinfectante, în ultimul timp au apărut o serie de lucrări care testează acțiunea acestora asupra particulelor virale (Ivan, 1981).

c) *Profilaxie specifică.* Imunoglobulinele umane normale ar putea constitui un mijloc de profilaxie, prezența anticorpilor față de numeroase tipuri antigenice de enterovirusuri la titruri ridicate fiind raportate de numeroși autori (Venedectova și colab., 1975; Hovanova și colab., 1978).

Prepararea de vaccinuri și testarea lor pe animale de experiență a constituit de-a lungul timpului o preocupare pentru diferite colective. La om, pînă în prezent nu a intrat în uz vaccinarea aceasta datorită zecilor de tipuri antigenice care circulă în natură și afectează omul. Totuși, în situații epidemiologice în care îmbolnăvirile sînt determinate de un singur

tip antigenic ar fi posibilă prepararea unui vaccin, așa cum s-a propus pentru EV71 în afecțiuni ale SNC (Sindarov și colab., 1978) sau pentru virusul Coxsackie B4 în protejarea tinerilor față de îmbolnăvirile prin diabet juvenil (Mangh, 1979). Vaccinul anti-EV71, preparat în Institutul de Poliomielită și Encefalite Virale din Moscova prin inactivare cu formol și adsorbție cu $Al(OH)_3$, a fost aplicat în Bulgaria cu ocazia epidemiei de boală poliomielitiformă la 121 de copii de 1—4 ani. Eficacitatea a fost demonstrată prin evidențierea seroconversiei care după a doua inoculare de vaccin a atins proporția de 93,6% dintre copiii vaccinați.

3.2. PATOGENIE

Patogenia infecțiilor enterovirale a fost studiată în special pentru virusul poliomielitic dar, probabil, că aceasta este identică și pentru celelalte enterovirusuri.

Pătrunzînd în celulele faringiene și în anumite celule intestinale, virusurile trec în ganglionii limfatici și în plăcile lui Payer unde se multiplică. Apoi, ca urmare a unei faze de viremie ele pot ajunge în diferite organe și se pot multiplica acolo, dacă găsesc la suprafața celulelor receptori care să le permită fixarea. Diseminarea pe cale sanguină a enterovirusurilor într-un număr mare de organe-țintă explică extrema varietate a patologiei dar, totodată, și slaba specificitate a sindroamelor observate (Bricout, 1971; Fenner și White, 1976; Duca, 1979).

Ca urmare, șansele de izolare a enterovirusurilor sînt mai mari dacă prelevările de produse patologice au loc în cursul perioadei acute febrile a bolii. În perioada de diseminare sanguină virusul poate fi izolat din cheagul sanguin. Prezența virusului în fecale, în mare cantitate și pe o perioadă de timp relativ îndelungată constituie cea mai importantă sursă de enterovirusuri. În faringe enterovirusurile sînt prezente numai timp de 4—6 zile de la debutul bolii. Prezența enterovirusurilor în lichidul cefalorahidian, recoltat în perioada reacției celulare, apare deosebit de importantă pentru punerea diagnosticului etiologic în diferite neuroinfecții.

Infecția enterovirală, în general, nu prezintă un aspect clinic sever, terminîndu-se cu puține sau chiar fără efecte tisulare reziduale. În cazurile în care infecția este însoțită de invazie secundară a unor țesuturi (a SNC, în special, și a mușchilor) se pot evidenția leziuni morfopatologice caracteristice. Pătrunse în organism, enterovirusurile determină reacții de apărare specifice și nespecifice ale organismului, similare cu cele din toate infecțiile.

Sediul enterovirusurilor în organismul infectat este similar atît în infecțiile clinic aparente cît și în cele inaparente. Se consideră că pentru trecerea de la starea de latență la boala clinic aparentă este necesară intervenția anumitor factori favorizanți: stare de denutriție, surmenaj fizic, perturbări hormonale etc. Acești factori, în special la vîrsta copilăriei ar acționa asupra mecanismelor umorale și celulare de apărare nespecifică favorizînd pătrunderea virusului în celulă și înlesnind multiplicarea lui sau ducînd la exacerbarea virulenței acestuia. Nu sînt excluse nici infecțiile enterovirale persistente cu o patologie similară celei din alte viroze (Cajal și Cernescu, 1978).

Scanned with OKEN Scanner

3.3. MANIFESTĂRI CLINICE

Enterovirusurile sînt considerate, pe bună dreptate, agenţii patogeni cu cel mai mare polimorfism clinic, atît din punctul de vedere al diversităţii sindroamelor provocate (fig. 3.5), cît şi din punctul de vedere al gravităţii bolii care se poate manifesta de la forme inaparente şi pînă la forme clinice grave, letale (Bricout, 1971; Phillips şi colab., 1980; Vâţă şi colab., 1980). În plus, aşa cum reiese din tabelul 3.5, un acelaşi tip antigenic de enterovirus poate determina numeroase sindroame, foarte diferite unele de altele,

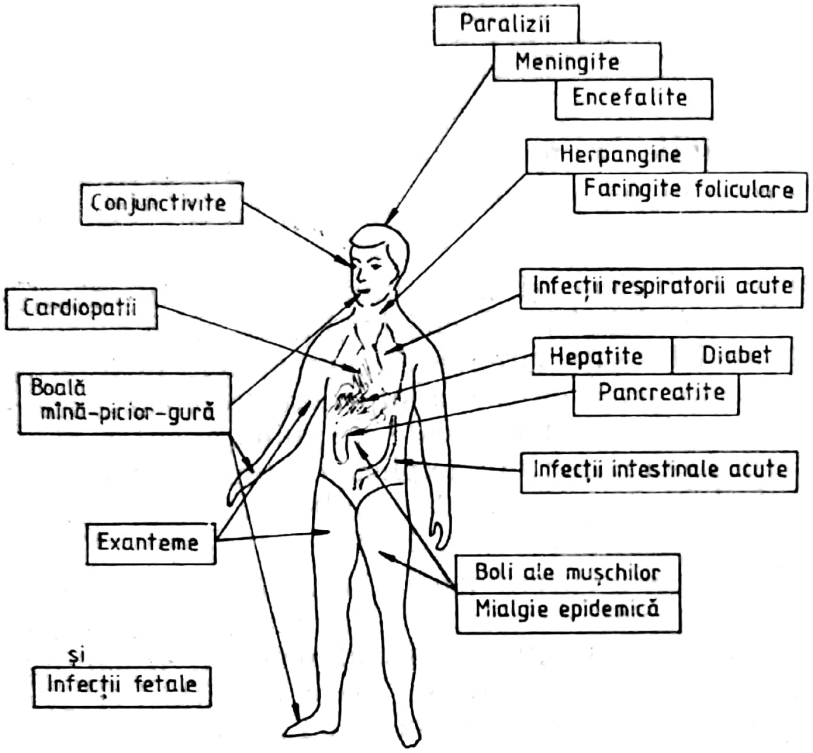


Fig. 3.5. — Manifestările clinice determinate de enterovirusuri nepoliomielitice.

după cum acelaşi sindrom poate fi provocat de mai multe tipuri antigenice de enterovirusuri.

Diversitatea sindroamelor clinice şi larga circulaţie a enterovirusurilor în masa populaţiei fac ca diagnosticul etiologic în afecţiunile enterovirale să întîmpine o serie de dificultăţi. Astfel, în timp ce unele afecţiuni, cum ar fi paraliziile, meningitele, herpanginele, boala Bornholm, cardiopatiile sînt în mod net asociate cu enterovirusurile, în altele (diareea, boli renale, orhita etc.) mai sînt necesare studii pentru a se dovedi relaţia etiologică cu aceşti agenţi patogeni. Implicarea enterovirusurilor nepoliomielitice în etiologia unor cazuri clinice numai pe baza izolării acestora din produse patologice nu este justificată, fiind necesar pentru aceasta o confirmare serologică bazată pe apariţia sau creşterea de cel puţin 4 ori a titrului anticorpilor serici faţă de tipul antigenic de enterovirus izolat. Totuşi, izolarea din sînge, lichid cefalorahidian sau organe permite un diagnostic etiologic de prezumţie (Grist şi colab., 1978; Malcom şi colab., 1980).

3.3.1. BOLI NEUROLOGICE

Manifestarea clinică cea mai frecventă în cadrul neuroinfecţiilor determinate de enterovirusuri este reprezentată de meningita virală urmată de afecţiunile paralitice şi, mai rar, de encefalite (Grist şi colab., 1978).

Tabelul 3.5

Sindroamele clinice determinate de diferite tipuri antigenice de enterovirusuri

Boli	Specificaţie	Polio	Virusuri Coxsackie		ECHO	Noi entero-virusuri
			Subgrup A	Subgrup B		
Neurologice	Meningite	1, 2, 3	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 30, 31, 32	71
	Paralizii	1, 2, 3	3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 21, 23	1,2 , 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19, 30	70, 71
	Encefalite		2, 5, 6, 8 9, 16	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 14, 17, 25	71
Musculare	Mialgia epidemică		4, 6, 9, 10	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 6, 9, 19	
Cardiace	Miopericardita acută		1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 16	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 3, 4, 6, 8, 9, 14, 19, 22, 25, 30, 33	
	Boli cronice cardiace			1, 2, 3, 4, 5		
Ale pielii şi mucoaselor	Enanteme : herpagina		2, 3, 4, 5, 6, 7, 3, 9, 10, 16	2, 4, 5	6, 9, 16, 19	
	Exanteme		2, 4, 5, 6, 8, 9, 16	1, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 19, 25, 30, 32, 33	
	Boala mînă-picior-gură		5, 6, 7, 9, 10,16	2, 5		71
Respiratorii	—		2, 9, 10, 21, 24	2, 3, 4, 5	1, 4, 7, 8, 9, 11, 19, 20, 22, 25, 28	
Oculare	Conjunctivite		9, 24	2, 3, 4, 5	7, 9, 11, 16, 28	70
Ale aparatului digestiv	Boala diareică		9	3	2, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 22, 23, 24	
	Hepatita (?)		10, 24	2	4, 6, 9	
	Pancreatita		9	1, 2, 3, 4, 5		
	Diabetul zaharat			1, 4, 5		
Fetale şi nou-născutului	Antenatale		9	1, 2, 3, 4, 5, 6	9, 10, 11, 14, 19, 21, 22	
	Perineonatale			1, 2, 3, 4, 5, 6	6, 7, 11, 17, 18, 19, 20, 22 31	71
Alte boli	Renale			4	9	
	Orhită		9	4		
	Parotidită			3		

Scanned with OKEN Scanner

3.3.1.1. *Meningita aseptică.* Ponderea meningitelor enterovirale din totalul meningitelor cu lichid clar nu este încă nici în prezent bine cunoscută, acestea putînd fi determinate și de alte virusuri (urlian, cel al coriomeningitei limfocitare, herpetic, Epstein-Barr, encefalitic etc.), de bacterii și paraziți (bacilul tuberculozei, leptospire, spirochete, micoplasma pneumoniae, toxoplasma, trichinelle etc.) sau de alți agenți cauzali (vaccinuri, reacții parameningiene). Se apreciază că meningitele enterovirale ar reprezenta o proporție de aproximativ 20—45% din totalul meningitelor cu lichid clar (Bégué și Laplane, 1975; Böthig și Starke, 1978; Bertrand și colab., 1980; Reznick și colab., 1981) și chiar de 67% în cazuri epidemice (Jdanovskaia și colab., 1981).

Ca manifestare clinică, de regulă meningitele enterovirale au un debut brutal, cu cefalee, grețuri și/sau vărsături, febră, rahialgii. Cu toată intensitatea fenomenelor dureroase și febrile starea generală este puțin atinsă. Examenul clinic obiectiv arată un sindrom meningian moderat: rigiditatea cefei, semnele Kernig și Brudzinski puțin pronunțate. Convulsiile pot să apară în unele cazuri iar în altele se poate constata o implicare severă a sistemului nervos central manifestată prin meningoencefalită, encefalită sau encefalomielită (Deibel și Flanagan, 1979).

Examenul lichidului cefalorahidian permite să se suspecteze etiologia virală a meningitei pe baza unui lichid clar sau ușor tulbure cu o limfocitoză variind între 50 și 500 de elemente pe milimetru, cu o albuminorahie normală sau foarte ușor crescută și cu o glicorahie normală. Trebuie de menționat, totuși, că în primele 24—48 de ore limfocitoza este precedată de o polinucleoză tranzitorie (70—80%), ceea ce simulează o meningită bacteriană, polinuclearele fiind, însă, cu aspect normal. Se constată concomitent o creștere a proteinorahiei în special în infecțiile cu virus ECHO.

Așa cum reiese din tabelul 3.5, aproape toate tipurile antigenice de enterovirusuri au fost implicate în îmbolnăvirile de meningită, inclusiv EV71 izolat relativ mai recent (Kennett și colab., 1975; Deibel și Gross, 1979). Nu există semne clinice distinctive prin care cazurile de meningită aseptică cu virus Coxsackie să fie diferențiate de cele cauzate de virusurile ECHO sau poliovirusuri. Asocierea ocazională a meningitei cu semne de mialgie sau herpangină poate orienta diagnosticul spre o meningită determinată de virusul Coxsackie B sau A.

Evoluția este în general favorabilă, majoritatea cazurilor vindecîndu-se complet în cîteva zile-săptămîni, fără sechele (Wilfert și colab., 1981). Irascibilitatea și astenia pot persista mai multe săptămîni iar la pacienții în primul an de viață există un oarecare risc, redus, de tulburări neurologice sau cardiace. Recidivele în meningita enterovirală pot să apară datorită infecției cu alte tipuri antigenice, dar niciodată cu același. O formă particulară de meningită cronică a fost descrisă de Bodensteiner și colab. (1978) la un pacient cu hipogamaglobulinemie determinată de virusul ECHO tip 5.

Meningita aseptică determinată de enterovirusuri predomină la copii și se poate manifesta prin cazuri sporadice sau epidemice în funcție de intensitatea circulației anterioare a unor tipuri antigenice de enterovirusuri și de acumularea masei receptive. În țările cu climă temperată se constată o sezonalitate a acestor îmbolnăviri, în timp ce în țările tropicale boala este întîlnită în tot cursul anului (Reznik și colab., 1980; Obert și colab., 1981).

Scanned with OKEN Scanner

De-a lungul timpului, au fost descrise în literatura de specialitate numeroase epidemii de meningită virală determinate de enterovirusuri nepoliomielitice. Redăm în tabelul 3.6 cîteva dintre acestea descrise în ultimii 8 ani în diferite zone ale globului. Pentru majoritatea tulpinilor de enterovirusuri menţionate ca reprezentînd agenţi etiologici ai menin-

Tabelul 3.6

Serotipurile de enterovirusuri nepoliomielitice implicate în unele episoade epidemice de meningită virală (1975 — 1981)

Autorul	Anul	Ţara	Nr. cazuri	Enterovirus implicat	
				Virusologic	Confirmat serologic
Sharp şi Bell	1975	Marea Britanie	194	E4	+
Vâţă şi colab.	1975				
Zavate şi colab.	1976a	România	807	E4	+
Codd şi colab.	1976	Marea Britanie	268	E19	0
Vâţă şi colab.	1976a				
Zavate şi colab.	1976b	România	64	B3	+
Stagni şi colab.	1977	Italia	28	E30	+
Ball	1979	Marea Britanie	290	E19	?
Karte şi Wecker	1978	R. F. Germania	48	E30	+
Moore şi colab.	1979	S.U.A.	117	E9	?
Heinz şi colab.	1980	Cehoslovacia	830	E6	+
Vâţă şi colab.	1980	România	131	B2+B4	+
Reznick şi colab.	1980	U.R.S.S.	779	E4	+
Obert şi colab.	1981	Franţa	184	E 30	0
Dömök şi colab.	1981	Ungaria	?	EV71	?

gitei, s-a putut obţine izolarea virusului din fecale, lichid cefalorahidian sau/şi sînge şi s-a înregistrat un răspuns serologic specific de tip.

În ţara noastră, Duca şi colab. (1957a, b, c, d) au descris pentru prima dată un focar epidemic cu trei cazuri paralitice reversibile şi altele cu meningită, mialgie sau fenomene respiratorii. Virusul Coxsackie a fost izolat la bolnavi, precum şi la numeroşi purtători aparent sănătoşi. În cadrul focarului au mai fost descrise şi alte cazuri cu fenomene musculare sau neurologice cum ar fi miozita tip Bornholm, acrodinia, poliradiculonevrita (Caraman şi colab., 1962). În anul 1960, Voiculescu şi colab. au izolat şi au identificat serologic pentru prima dată în ţară virusul ECHO 12 de la un bolnav de meningită cu lichid clar şi cu exantem. În perioada 1965—1971, Ciugarin şi colab. (1968, 1970, 1971) au demonstrat, la rîndul lor, rolul enterovirusurilor nepoliomielitice în etiologia cazurilor de meningită virală internate în Clinica I de Boli infecţioase Bucureşti.

În Moldova, Zavate şi colab. (1971 a, b) studiind frecvenţa circulaţiei virusurilor ECHO au izolat în perioada 1968—1970, de la cazuri sporadice de meningită virală, virusul ECHO tip 1, 5 şi 12 iar în zona Cluj-Napoca, Ionescu şi colab. (1972) virusuri Coxsackie A care, după aceşti autori, au avut un rol semnificativ în etiologia unor cazuri de meningită cu lichid clar.

După Combiescu şi colab. (1973), în perioada 1970—1973 în unele regiuni ale ţării meningitele virale au reprezentat 2/3 din totalul cazurilor

Scanned with OKEN Scanner

de neuroinfecţii, enterovirusurile izolate făcînd parte din grupul Coxsackie şi ECHO (tip predominant ECHO 9).

În cursul anului 1973, în teritoriul oraşului Iaşi şi în împrejurimi a fost semnalată cea mai mare epidemie de meningită virală din ţara noastră, determinată de virusul ECHO tip 4 — cu cel puţin 1 400 de cazuri (fig. 3.6) — studiată din punct de vedere clinic de Vâţă şi colab. (1974, 1975, 1976 a, b) şi din punct de vedere virusologic de Zavate şi colab.

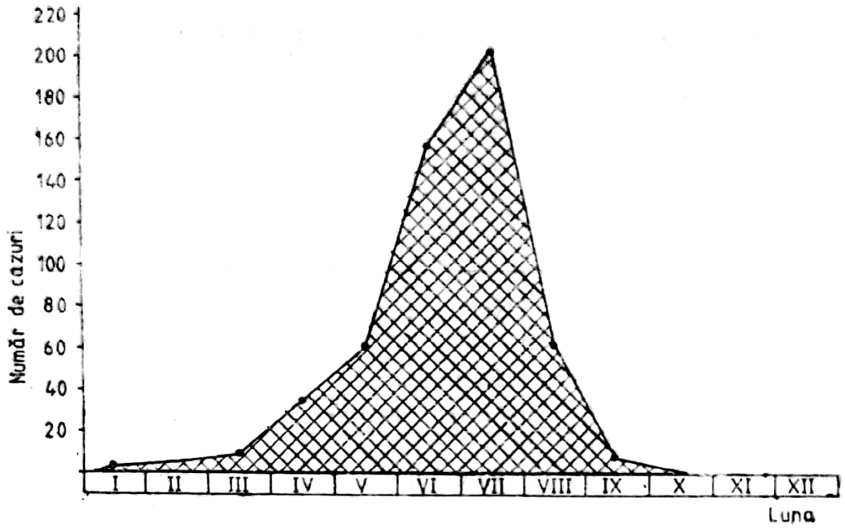


Fig. 3.6. — Evoluţia epidemiei de meningită virală cu virus ECHO tip 4 (după Vâţă şi colab., 1974).

(1976 a). Au fost internaţi 807 bolnavi, în majoritate (68,7%) copii iar mulţi alţii au făcut boala la domiciliu. Simptomatologia a fost cea clasică, în 7,2% însoţită de erupţie papuloasă fină. La sugari convulsiile s-au înregistrat într-o proporţie de 21,0% din cazuri. O parte din examenele virusologice pozitive au fost confirmate serologic. În aceeaşi zonă a României, în anul 1975 a fost descrisă o nouă epidemie de meningită virală, de intensitate mai mică de această dată, cu virus Coxsackie B3 (Vâţă şi colab., 1976 a; Zavate şi colab., 1976 b) iar în anul 1976 o alta determinată de virusurile Coxsackie B2 şi B4 (Vâţă şi colab., 1980), de asemenea confirmate serologic în unele cazuri.

Voiculescu şi Brăiloiu—Ciugarin (1977), analizînd rezultatele virusologice obţinute la 212 bolnavi adulţi cu diagnosticul de meningită virală în perioada 1968—1974, au raportat izolări de virusuri Coxsackie şi ECHO într-o proporţie de 37,7% din cazuri, formele clinice avînd uneori un aspect mai grav. Au predominat virusurile Coxsackie A6, A8, B3 şi B4 şi unele tipuri antigenice de vir s ECHO.

3.3.1.2. *Paralizii.* Fără îndoială că poliovirusurile rămîn cauza principală a paraliziilor în majoritatea zonelor endemice de pe glob cu toate că ele au fost substanţial reduse de programele eficiente de imunizare antipoliomielitică. În schimb, an de an s-au semnalat tot mai multe cazuri sporadice de neuroinfecţii paralitice de la care s-au izolat virusurile Coxsackie şi ECHO (Voroşilova, 1977; Zeller şi Coulanges, 1980). Neuropatogenitatea acestora a fost demonstrată şi experimental pe animale de laborator.

Tabloul clinic al paraliziilor este similar cu cel determinat de virusurile poliomielitice. Totuşi, s-a semnalat că boala are o evoluţie mai puţin

gravă şi debutează de cele mai multe ori insidios, fără febră (Lescinskaia şi colab., 1979). Foarte rar se schiţează o evoluţie bifazică. La un sindrom meningeal sau gripal, cu curbatură şi dureri musculare ale membrelor se adaugă paraliziile care se localizează cel mai frecvent la membrele inferioare sau la braţe. Pot să apară şi paralizii faciale, abdominale sau la muşchii cefei. Paraliziile determinate de enterovirusurile nepoliomielitice, cu excepţia virusului Coxsackie A7 şi a EV71, se vindecă fără sechele şi cu totul excepţional pot duce la un sfîrşit letal (Bricout, 1971 ; Chabout şi colab., 1978).

Tipurile antigenice de enterovirusuri nepoliomielitice implicate în îmbolnăvirile paralitice sînt notate în tabelul 3.5. Menţionăm în ultimii ani predominanţa virusurilor Coxsackie A7, A4, A11, A6, a virusurilor Coxsackie B2, B3, B5 şi B6, a virusurilor ECHO tipurile 1, 3, 4, 6, 14, 30 şi a unora dintre enterovirusurile nou-identificate (Grist şi colab., 1978). Astfel, recent au fost descrise în literatura de specialitate numeroase îmbolnăviri poliomielitiforme determinate de EV71 care este considerat cel mai important enterovirus descoperit din anul 1958 şi pînă în prezent (Vâţă, 1979 ; Sindarov şi colab., 1979 ; Chonmaitre şi colab., 1981 ; Dömök şi colab., 1981). Izolat în Europa, America, Australia, Japonia în perioada 1967—1974, de la cazuri paralitice şi de meningită, EV71 a determinat în anul 1975 în Bulgaria o epidemie gravă cu 700 de cazuri particularizată prin frecvenţa mare a paraliziilor (21,0%) şi a cazurilor letale (6,3%). Din cele 89 de tulpini izolate, 36 au provenit din creierul sau măduva cazurilor mortale. Au fost confirmate prin izolarea virusului şi/sau prin teste serologice 194 de cazuri dintre care 20 cu paralizie spinală, 35 cu paralizie bulbară (26 fatale) şi 6 cu paralizia bulbară a celui de-al VII-lea nerv cranian. Leziunile anatomopatologice constatate au fost similare cu cele determinate de poliovirus.

În ţara noastră, Ionescu-Mihăieşti şi colab. (1954) au izolat pentru prima dată virusul Coxsackie de la un caz suspect de poliomielită. În perioada 1954—1956, colectivul Institutului de virusologie Bucureşti (Schwartz şi colab., 1955 ; Dan şi colab., 1956 ; Samuel şi colab., 1958) au izolat la rîndul lor tulpini de virus Coxsackie de la cazuri poliomielitiforme. Într-un studiu asupra izolărilor de enterovirusuri în diferite zone ale României în perioada epidemiei de poliomielită din 1957—1958, Ionescu-Mihăieşti şi colab. (1959) au relatat că din 34 de tulpini de virus Coxsackie, 8 au fost izolate de la cazuri paralitice.

În Moldova, în anul 1956, Duca şi colab. au izolat virusul Coxsackie A10 de la un bolnav cu pareză a membrului inferior stîng, serul bolnavului recoltat în a 69-a zi de la îmbolnăvire neutralizînd virusul pe şoarecele sugar. În zona Timişoarei, Topciu şi colab. (1960 a) au izolat virus Coxsackie de la un bolnav cu paralizie dintr-un focar cu 11 cazuri dintre care unele determinate de poliovirus, iar în Cluj-Napoca au fost izolate virusurile Coxsackie A2, A4 şi A5 în focare de poliomielită (Baboş şi colab., 1962) şi Coxsackie A2, A7 şi A14 de la cazuri cu paralizii de facial (Ionescu şi Munteanu, 1965). Într-o sinteză a rezultatelor virusologice obţinute în perioada 1961—1966 în Clinica de boli infecţioase de pediatrie din Bucureşti, Bruckner şi colab. (1962, 1969) au arătat că frecvenţa izolărilor de enterovirusuri nepoliomielitice la 382 de cazuri de neuroinfecţii paralitice a fost de 2—4 ori mai mare în comparaţie cu un grup martor de 458 de pacienţi cu alte infecţii.

Studiul dinamicii anticorpilor neutralizanţi la bolnavii cu neuroviroză paralitică a relevat adesea o seroconversie pentru tipul antigenic

Scanned with OKEN Scanner

în cauză, dar cîteodată și pentru altele (Ciugarin și Giuglea, 1970; Bruckner și colab., 1972).

În Moldova au fost izolate virusurile ECHO tip 1 și 11 de la pacienți cu paralizie de facial și, respectiv, poliradiculonevrită (Zavate și colab., 1971a). În aceeași perioadă izolări de virusuri Coxsackie de la cazuri de neuroviroză paralitică au mai fost raportate și de alți cercetători (Combiescu și colab., 1971; Voiculescu și colab., 1973).

În anul 1975, Predescu și colab. au semnalat la 6 din 35 de pacienți cu neuroviroză paralitică frecvența asocierilor dintre două enterovirusuri (poliovirus + virus Coxsackie sau Coxsackie + Coxsackie) autorii opinînd pentru potențarea lor reciprocă.

Analizînd evoluția clinică și rezultatele examenelor virusologice la 63 de cazuri de paralizii spinale determinate de enterovirusuri nepoliomielitice survenite în diferite zone ale României în perioada 1970—1977, Combinescu și colab. (1978) au arătat că 49 cazuri au evoluat către remisiunea completă a deficitului motor iar 14 au rămas cu sechele paralitice și atrofii. Incidența izolărilor a fost aproximativ egală pentru virusurile Coxsackie subgrup A, subgrup B și pentru virusuri ECHO.

În anul 1979, Voiculescu și colab. au publicat rezultatele unui studiu clinic și virusologic pe un interval de 5 ani (1973—1977) asupra a 54 de pacienți adulți cu manifestări neurologice (cu angajarea nervilor cranieni, a căilor piramidale și extrapiramidale și a formației reticulate). Au fost izolate 4 tulpini de poliovirus, 30 de virus Coxsackie și 20 de ECHO.

3.3.1.3. *Encefalite.* Encefalitele enterovirale sînt relativ rare, ele reprezentînd 2,4% din totalul cazurilor cu diagnostic de encefalită (* * *, 1973; Cloppe și colab., 1977). Afectarea creierului sub formă de encefalită, encefalomielită, ataxie, fenomene parkinsoniene, sindroame tip Landry-Guillain-Barré etc., cu sau fără sechele, a fost descrisă în special la nounăscuți și la sugari, îmbolnăvirile fiind mai frecvente în lunile de vară și toamnă (Deibel și Flanagan, 1979a).

Acest sindrom are debut nespecific cu febră ușoară și dificultăți în alimentarea sugarului. Atunci cînd totul pare să reintre în normal, se produce o reascensiune termică și se instalează brutal un sindrom de insuficiență respiratorie și cardiacă, cu tahicardie și zgomot în galop. Uneori se găsesc asociate icter cu hepatomegalie sau sindrom hemoragic. Evoluția este cel mai des fatală, uneori într-un timp foarte scurt, de cîteva ore, prin colaps, dar uneori poate surveni și vindecarea.

Tipurile antigenice de enterovirusuri implicate în cazuri de encefalită sînt redate în tabelul 3.5. O asociere mai convingătoare se poate face cu acele tipuri care au fost izolate din creier, măduva spinării și/sau lichid cefalorahidian: ECHO tip 17 (Hart și Miller, 1973), ECHO tip 5 (Foncin și colab., 1977), Coxsackie B6 (Cloppe și colab., 1977), Coxsackie B3 (Seringe 1978). Începînd cu anul 1976 au fost descrise cazuri grave de meningoencefalită asociate cu EV71 (Aymard și colab., 1979; Deibel și Gross, 1979b).

În țara noastră, în 1968, Ciugarin și colab. au semnalat izolarea virusului ECHO tip 11 din lichidul vezicular de la un pacient cu encefalită acută însoțită de o erupție veziculoasă, generalizată, caz confirmat serologic. Într-o monografie publicată în 1971, Predescu și Taindel au detaliat aspectele clinice ale encefalitei de origine enterovirală și a posibilităților de diagnostic din acea epocă. Bruckner și colab. (1972) au accentuat asupra predominanței formei encefalitice de neuroinfecție în cazurile

cu virus ECHO iar Rebedea şi Ciugarin—Brăiloiu (1975) au descris un caz excepţional de encefalită primară determinată de virusul Coxsackie A16 care de regulă a fost implicat în afecţiuni eruptive.

În sfîrşit, trebuie să menţionăm că în literatura de specialitate din ultimii ani, enterovirusurile ECHO tip 3, 5, 11 şi 17 au mai fost implicate şi în etiologia unor îmbolnăviri cronice degenerative ale SNC în special la imunodeficienţi (Tyrrell, 1978; Weiner şi colab., 1979).

3.3.2. BOLI ALE MUŞCHILOR

Miotropismul enterovirusurilor din grupul Coxsackie B a fost demonstrat atît pe om (boala Bornholm) cît şi experimental pe animale de laborator. Îmbolnăvirea la om (denumită boala Bornholm sau pleurodinia epidemică) debutează brusc, după o incubaţie de 2—4 zile, cu febră (39°—40°C), cefalee, sughiţ etc. Foarte curînd simptomatologia este dominată de elementul dureros cu localizare musculară cu sediu toracic, abdominal sau pe orice alt grup muscular. Simptomatologia poate simula o embolie pulmonară, infarct miocardic sau o afecţiune medicală sau chirugicală abdominală, în special o apendicită acută. La palpare muşchii afectaţi sînt dureroşi, induraţi şi tumefiaţi. Leziunile musculare au fost confirmate prin examene morfopatologice. La mialgii se mai pot asocia şi o serie de alte simptome ca tulburări digestive (diaree sau anorexie), amigdalite, faringite sau, uneori, un exantem maculos. Mai rar s-au constatat adenopatii de mic volum, orhite, miocardite, pancreatite sau meningite.

Evoluţia este favorabilă. În 4—5 zile febra şi mialgiile cedează. Recăderile, înregistrate la 30—50% din cazuri, pot surveni după cîteva zile sau chiar săptămîni pe alţi muşchi decît cei afectaţi anterior. S-au semnalat particularităţi clinice în raport cu vîrsta, evoluţia fiind mai lungă la adulţi decît la copii iar localizările dureroase abdominale mai frecvente la aceştia din urmă (Bricout, 1971; Krugmann, 1977).

Ca agenţi etiologici a acestor manifestări clinice au fost implicate, cel mai adesea, virusurile din grupul Coxsackie B care au determinat în unele zone ale globului mari epidemii (tabelul 3.5). Virusurile din grupul Coxsackie A şi ECHO au fost mai rar asociate cu boala Bornholm.

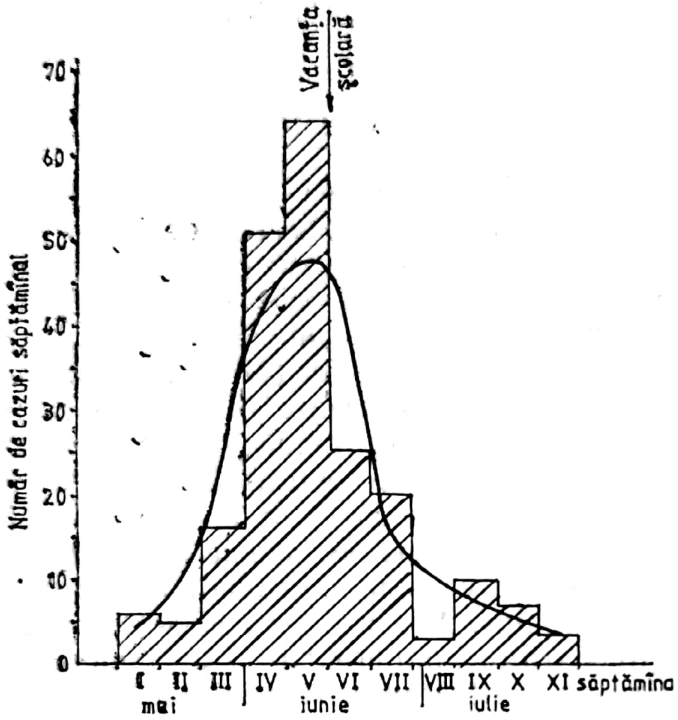
În ultimii ani s-a emis ipoteza implicării enterovirusurilor şi în unele boli cronice musculare ca polimiozita. Cu ajutorul microscopiei electronice antigenul viral a fost pus în evidenţă sub formă de structuri cristaline în celulele muşchilor scheletici şi ale muşchiului cardiac la o fetiţă de 10 ani cu miopatie cronică (Tang şi colab., 1975) şi la un bolnav cu boala Parkinson (Gyorkey şi colab., 1978). În primul caz a fost izolat virusul Coxsackie A9 iar în cel de-al doilea examenul serologic efectuat a confirmat etiologia pentru virusul ECHO 4. Polimiozita a fost reprodusă şi experimental pe şoarecele alb (Ray şi colab., 1979).

În ţara noastră, prima epidemie de boală Bornholm a fost semnalată şi studiată de Teodorovici şi colab. (1971), Duca şi colab. (1970) şi Zavate şi colab. (1976 a). Epidemia a evoluat într-o comună din nordul Moldovei în primăvara şi vara anului 1970 (fig. 3.7), afectînd în special preşcolarii şi şcolarii (tabelul 3.7).

Morbiditatea globală pe întreaga populaţie a fost de 5 939 la 100 000 locuitori. S-au înregistrat 12,4% focare familiale. Forma clinică predominantă a fost cea abdominală, simulînd în unele cazuri o apendicită acută.

Scanned with OKEN Scanner

Investigaţiile virusologice au permis izolarea din fecale şi exsudat faringian a virusului Coxsackie B1. Rezultatele virusologice au fost confirmate în unele cazuri şi de cele serologice înregistrîndu-se apariţia sau creşterea de 10—32 de ori a titrului anticorpilor specifici faţă de virusul izolat.



Tabelul 3.7

Incidenţa îmbolnăvirilor prin mialgie epidemică pe grupe de vîrstă (Teodorovici şi colab., 1971)

Grup de vîrstă	Morbiditatea (‰)
Sub 1 an	86,2
1—6 ani	287,9
7—14 ani	299,0
15 ani şi peste	3,4

Fig. 3.7. — Evoluţia epidemiei de boală Bornholm (după Teodorovici şi colab., 1971)

3.3.3. CARDIOPATII

În jurul anului 1965, în literatura de specialitate au început să apară studii asupra corelaţiei dintre unele afecţiuni ale cordului şi infecţia enterovirală la copilul nou-născut, sugar şi adult, materialul informaţional foarte bogat cumulat asupra acestui subiect fiind sintetizat în cîteva publicaţii în ţară şi străinătate (Ciugarin-Brăiloiu., 1972, 1973; Woodruff, 1980; Lerner şi Wilson, 1973). În acest capitol ne vom referi la problemă în general şi la cardiopatiile observate la adult şi copilul mare, manifestările clinice ale infecţiilor perinatale urmînd a fi detaliate în capitolul 3.3.8.

La nivelul cordului, infecţia enterovirală se poate manifesta prin pericardite, miocardite precum şi prin afecţiuni cardiace cronice.

Pericardita acută debutează cu sindrom infecţios, cu febră, catar al căilor respiratorii superioare, astenie, anorexie. Concomitent se notează dispnee, tahicardie şi dureri retrosternale (Bricout, 1971). Examenul clinic evidenţiază tahicardie şi prezenţa de frecături pericardice caracteristice; zgomotele cordului rămîn bine percepute iar pulsul paradoxal lipseşte. ECG arată, în general, unda T aplatizată sau inversată constituind cîteodată singurul semn obiectiv de afectare pericardică. În cazul în care pericardita nu se asociază cu alte manifestări clinice, evoluţia este benignă avînd o durată de aproximativ 15 zile. De fapt, gravitatea bolii ţine de atingerea miocardului. După Bricout (1971) afecţiunea acută se poate croniciza determinînd o pericardită constrictivă.

Miocardita evoluează tipic cu dispnee, paloare, vomă, dureri precordiale, tahicardie şi hepatomegalie. Electrocardiograma evidenţiază tulburări de repolarizare. În unele situaţii boala îmbracă simptomatologia unui infarct miocardic (Woods şi colab., 1975). Evoluţia este în general favorabilă, revenirea cordului la normal durînd, însă, mai multe luni. La copilul mic evoluţia este mult mai gravă, particularităţile clinice ale îmbolnăvirilor la aceştia urmînd a fi detaliate în capitolul 3.3.8.

La examenul anatomopatologic se constată afectarea de diferite grade a fibrei miocardice sub formă de stază vasculară, edem şi tumefierea fibrelor musculare, fibroză interstiţială şi/sau atrofia fibrelor miocardice cu picnoză nucleară, iar în evoluţii cronice calcifierea miocardului (Burch şi colab., 1975; Barson şi colab., 1981).

În ceea ce priveşte evoluţia bolii, ingestia de alcool, sarcina, prezenţa la sexul masculin, subnutriţia cronică duc la o creştere a gravităţii îmbolnăvirilor. O importanţă majoră o reprezintă virulenţa tulpinilor de virus Coxsackie, apariţia unor variante cardiotrope putînd să determine îmbolnăviri grave şi epidemii în special la nou-născuţi, dar şi la adulţi. Luînd drept criterii observaţiile cazurilor clinice la om şi rezultatele experimentelor pe animale, Lerner şi Wilson (1973) au propus o schemă privind evoluţia posibilă a unei miocardopatii virale:

Virus benign → Faza acută (infecţioasă) → restabilire completă

Virus virulent → Fază acută (infecţioasă) → moarte (?)

Virus virulent → Fază acută (infecţioasă) → Fază cronică neinfecţioasă ↓ moarte

Tot Lerner şi Wilson (1973), analizînd critic datele din literatura de specialitate grupează informaţiile în raport cu importanţa argumentelor în favoarea legăturii cauzale dintre enterovirusuri şi cardiopatii în: asociaţie etiologică de tip superior = H (*high*), mediu = M (*moderate*) şi scăzut = L (*low*).

În cazul cercetărilor *H*, cu grad de asociaţie de tip superior, relativ rare, virusul a fost izolat sau pus în evidenţă prin imunofluorescenţă sau microscopie electronică direct în miocard, endocard sau pericard. Reproducerea bolii pe animal creşte gradul de asociere a bolii cu enterovirusul respectiv.

În investigaţiile *M*, cu grad de asociaţie de tip mediu, virusul a fost izolat din exsudatul nazofaringian sau din fecale demonstrîndu-se totodată apariţia sau creşterea de 4 ori a titrului anticorpilor specifici sau prezenţa IgM la titru de peste 1/32.

În sfîrşit, cercetările cu grad de asociaţie *L* se bazează fie pe izolarea virusului din fecale şi exsudat, fie pe conversie serologică, fie pe prezenţa pe un singur ser a IgM la un titru de peste 1/32 sau a anticorpilor specifici la un titru de peste 1/128, ambele reprezentînd dovada unei infecţii recente.

La acestea adăugăm studiile care se rezumă doar la investigaţii serologice, pentru tipurile antigenice de virus Coxsackie B, efectuate la grupuri de pacienţi cu afecţiuni cardiace şi, comparativ, la grupuri martor. Unii autori au semnalat o frecvenţă mai mare a posesorilor de anticorpi la grupul de pacienţi cardiaci (Falase şi colab., 1979; Lavrova şi colab., 1981; El-Hagrassy şi colab., 1980), în timp ce alţii nu au găsit diferenţe

Scanned with OKEN Scanner

semnificative față de martori (Wood și colab., 1978; Cambridge și colab., 1979; Griffiths și colab., 1980).

În ceea ce privește tipurile antigenice de enterovirusuri implicate în cardiopatii, ele sînt în mare parte prezentate în tabelul 3.8, alături de gradul de asociere și de autorii care au raportat rezultatele respective.

Tabelul 3.8

Enterovirusuri implicate în boli cardiace

Diagnostic	Tip antigenic de enterovirus	Grad de asociere	Indicații bibliografice*
A. *BOLI ACUTE*	A1	LM	Grist și Bell (1968)*, (1974)
	A2	LM	Zöllner și Lydtin (1968)*
Miopericardite	A4	H	Grist și Bell (1968)*; Bell și Grist (1968)*
	A5	LM	Van Loon și Masson (1968)*
	A6	H	Bocearov și Melesina (1930)
	A8	LM	Grist și Bell (1968)*
	A9	LM	Grist și Bell (1968)*; Zöllner și Lydtin (1968)*
	A13	H	Burch și colab. (1975)
	A16	H	Grist și colab. (1968)*, (1969)*
	B1–6	H	Numeroase indicații bibliografice
	E1	LM	Bercovich și colab. (1968)*
	E4	LM	Meehan și Bertrand (1970)
	E6	LM	Van Loon și Masson (1968)*, Bell și Grist (1970)
	E9	H	Grist și Bell (1968)*,(1969)*, Monif și colab. (1967)*, Cherry și colab. (1967)*, Meehan și Bertrand (1970), Bell și Grist (1971)
	E14	LM	Van Loon și Masson (1968)*, Bell și Grist (1970)
	E19	LM	Bell și Grist (1970)
	E22	H	Maller și colab. (1967)*; Rusell și Bell (1970)*
	E25	LM	Bell și Grist (1968)*
	E30	LM	Lewes și Rainford (1970)*
B. *BOLI CRONICE* Miocardopatii cronice	B2	H	Burch și Colcolong (1969)*, Burch și colab. (1968)*
	B4	H	Burch și colab. (1968)*, Burch și Colcolong (1969)*
	B5	H	Burch și colab. (1968)*, Burch și Colcolong (1969)*
Pericardită congenitală	B3	H	Bates (1971)*
Pericardită constrictivă	B1	M	Moore și colab. (1969)*
Insuficiență aortică/mitrală	B4	H	Burch și colab. (1967)*, Burch și Colcolong (1969)*

* Bibliografie citată de Lerner și Wilson (1973) și completată. A = virus Coxsackie A; B = virus Coxsackie B; E = virus ECHO*; H = asociere de tip superior; M = de tip mediu; L = de tip scăzut

În producerea leziunilor de cord au fost implicate două mecanisme: (a) acțiune directă a virusului, cu distrugerea celulelor și afectarea profundă a funcțiilor ei, la sugar fiind adeseori mortale; (b) mecanism antigen-anticorp care ar determina o boală autoimună în fază postinfecțioasă; distrugerile și necrozele celulare pot reprezenta un antigen responsabil de declanșarea unui proces de hipersensibilitate și cronicizare a bolii.

Scanned with OKEN Scanner

Avînd în vedere aceste mecanisme posibile, infecţiile cu virusuri Coxsackie au fost asociate nu numai cu pericardita şi miocardita acută dar şi cu o serie de afecţiuni cronice ale cordului cum ar fi miocardopatia cronică, valvulitele, pericardita constrictivă etc., avînd o prevalenţă netă la bărbaţi. Aşa cum reiese din tabelul 3.8, multe dintre aceste observaţii pot fi încadrate în grupul *H* de asociere, enterovirusurile fiind evidenţiate prin imunofluorescenţă în miocard, aortă, rinichi, pancreas.

Rolul etiologic al enterovirusurilor în bolile cardiace a fost sugerat şi de studiile experimentale pe animale de laborator : maimuţă şi şoarecele alb (Lerner şi Wilson, 1973 ; Burch şi Harb, 1979 b).

Un aspect particular al problemei (care necesită şi continuarea investigaţiilor) îl constituie reluarea ipotezei etiologiei mixte virobacteriene a unor afecţiuni cardiace sau renale acute postreumatismale datorate asocierii infecţiei streptococice cu cea cu virus Coxsackie (Lozovskaia şi colab., 1978 ; Nunaev şi colab., 1979 ; Kogut şi colab., 1981).

În concluzie, mulţi autori mai consideră şi în prezent că rolul enterovirusurilor în etiologia unor boli cardiace acute sau cronice nu este încă pe deplin elucidat. Se impun cercetări pentru clarificarea patogenezei îmbolnăvirilor aplicînd examene morfopatologice prin imunofluorescenţă şi microscopie electronică completate de teste serologice specifice (Grist şi Bell, 1974 ; Grist şi colab., 1978).

3.3.4. BOLI ERUPTIVE

De-a lungul anilor s-au acumulat numeroase observaţii în care enterovirusurile nepoliomielitice au fost implicate în boli febrile sporadice sau epidemice însoţite de enantem sau exantem separate sau de ambele concomitent.

a) *Enanteme.* În literatura de specialitate au fost descrise diferite forme de enanteme dintre care herpangina apare cea mai caracteristică, alături de faringita nodulară şi stomatita veziculoasă.

Herpangina afectează în special copiii sub 3 ani şi se caracterizează prin febră, vomă, cefalee, dureri abdominale, disfagie şi eritem difuz al vălului palatin şi al faringelui pe care apar vezicule rotunjite cu diametrul de 1—4 mm, neconfluente, şi care se sparg uşor lăsînd loc unei ulceraţii fine. Ele nu ating amigdalele şi limba. Faringita nodulară se caracterizează prin leziuni micronodulare pe faringele posterior, fără vezicule şi ulceraţii. Boala are o perioadă de incubaţie de 5 zile şi durează 4—14 zile. Stomatita veziculoasă afectează limba, vălul palatin, amigdalele putînd forma ulceraţii mai importante decît cele din herpangină (Hasegawa, 1975). Cea mai mare epidemie de stomatită veziculoasă cu 617 cazuri a fost semnalată recent în Singapore, fiind determinată de virusul Coxsackie A16 (* * * 1982 a).

Pînă în prezent, herpangina a fost asociată cu virusurile Coxsackie A7 şi 9, Coxsackie B5 şi virusurile ECHO tip 6, 9, 16 şi 19, faringita limfonodulară cu virusul Coxsackie A10, iar stomatita veziculoasă cu virusul Coxsackie A16.

În ţara noastră, între anii 1958 şi 1961, s-au înregistrat în diferite localităţi din Transilvania îmbolnăviri de angină veziculoasă şi herpangină de la care s-au izolat virusurile Coxsackie A5, A6, A4 şi B (Baboş şi colab., 1962 ; Marinescu şi colab., 1962). Vâţă şi colab. (1977) au descris un episod epidemic estival cu 6 cazuri de faringoamigdalită, avînd un tablou

Scanned with OKEN Scanner

clinic de angină streptococică şi de la care s-a izolat din exsudatul faringian şi/sau din fecale virusul Coxsackie B4, examenele bacteriologice fiind negative. Diagnosticul virusologic a fost confirmat prin examene serologice (tabelul 3.9).

Tabelul 3.9

Rezultatele examenelor virusologice şi serologice la copii cu angine (Vâţă şi colab. 1977)

Bolnav	Examene virusologice					Examene serologice pentru virus Coxsackie B4	
	L.c.r.	Exsudat	Fecale				
			I	II	III	ser I	ser II
1	0	0	0	0	B4	0	1/20
2	0	B4	0	0	B4	1/10	1/80
3	B4	0	B4	0	0	1/40	1/320
4	0	B4	0	0	0	1/10	1/80
5	0	B4	0	0	0	1/10	1/640
6	0	0	0	0	0	0	1/20

Recent, Zavate şi colab. (1983) au arătat că aproximativ 1/3 din cele 25 cazuri de angine herpetiforme au putut fi asociate cu enterovirusuri din grupul Coxsackie identificîndu-se tipurile A5 şi A4.

b) *Exanteme.* Leziunile cutanate determinate de enterovirusurile nepoliomielitice se caracterizează printr-un polimorfism accentuat putînd îmbrăca forme de exanteme veziculoase, maculopapuloase, urticariene, peteşiale, rujeoliforme (Deseda-Tous şi colab., 1977).

Elementele eruptive apar pe faţă, se întind pe gît şi în regiunea scapulohumerală, alteori sînt întîlnite pe trunchi şi mai rar pe extremităţi. Se menţionează şi unele cazuri cu erupţie generalizată. Erupţia apare odată cu febra sau cu vîrful curbei febrile. Evoluţia este benignă.

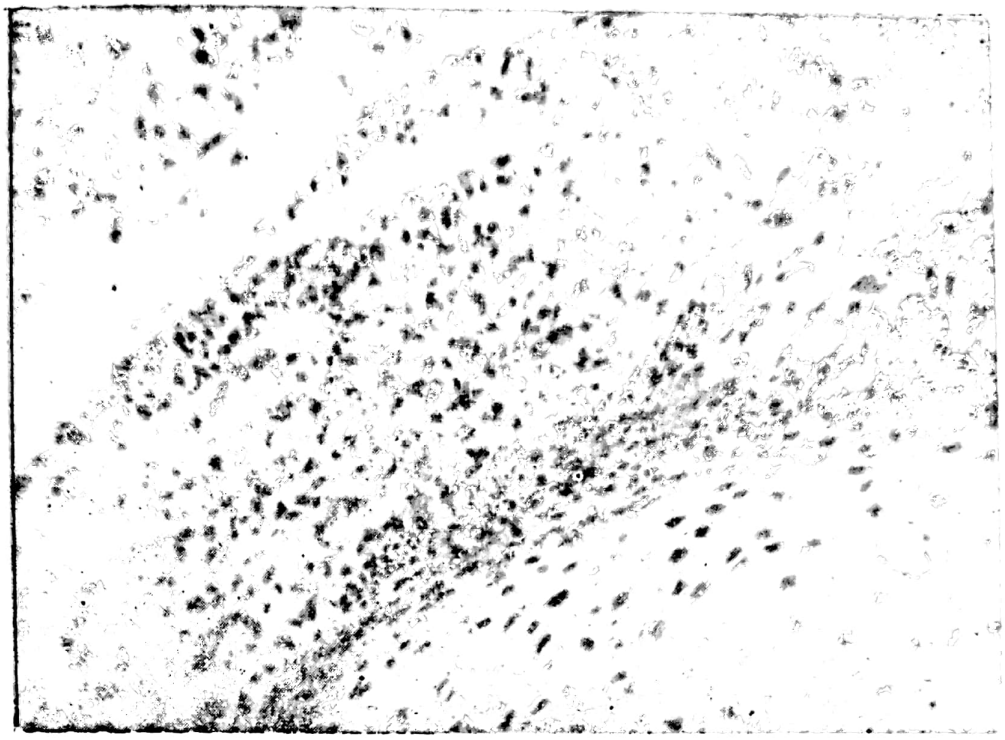
Au fost descrise, în special în colectivităţi de copii mici (maternităţi, leagăne etc.), epidemii asociate mai frecvent cu virusurile Coxsackie A9, A16 şi B5 şi virusurile ECHO tip 4, 9 şi 16. Mai rar au fost implicate şi alte tipuri antigenice menţionate în tabelul 3.5. Virusurile au fost izolate din fecale, exsudat faringian, dar şi din lichidul vezicular sau leziunile cutanate. Diagnosticul etiologic în unele epidemii a fost confirmat prin conversie serologică.

În ţara noastră, Voiculescu şi colab. (1973) au izolat virusurile Coxsackie A8 şi A6 de la pacienţi adulţi cu boli febrile însoţite de exantem.

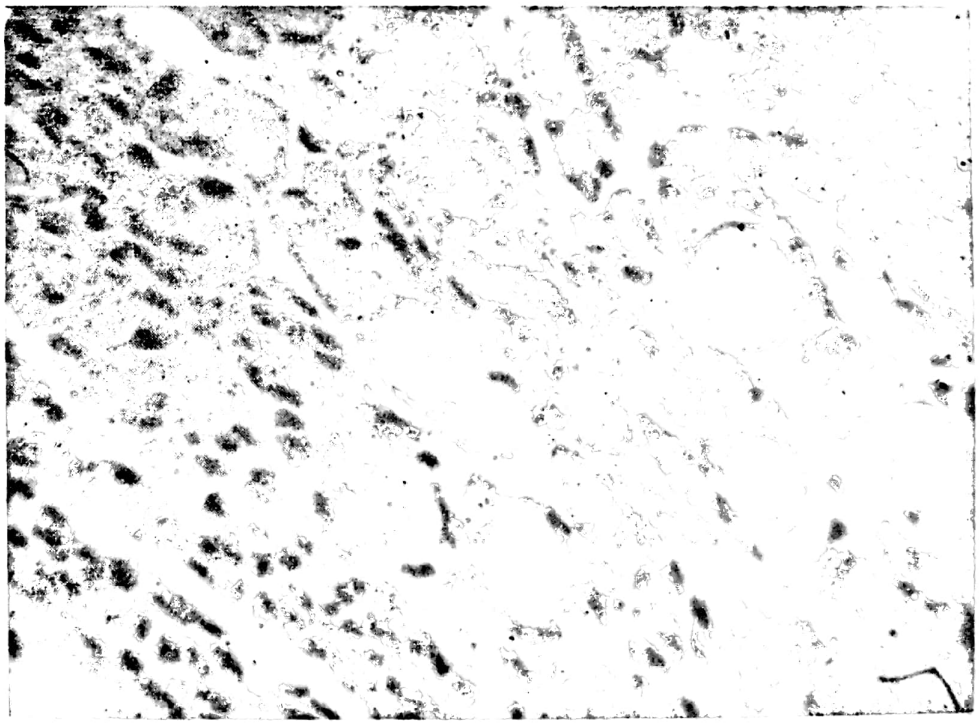
c) *Boala mînă-picior-gură.* Afectînd atît pielea cît şi mucoasele, această boală a fost descrisă pentru prima dată în 1958 în Canada, la Toronto. Ulterior, epidemii extinse sau focare mai reduse au fost semnalate în diferite ţări de pe glob, aşa cum reiese din tabelul 3.10, în care sînt menţionate şi tipurile antigenice asociate cu această boală.

Boala se caracterizează prin febră şi erupţie vezicular pe mucoasa bucală şi limbă, şi, mai rar, pe palat, gingii şi buze. Concomitent se constată un raş şi vezicule care apar pe faţa dorsală a mîinilor şi picioarelor,

Scanned with OKEN Scanner



a



b

Fig. 3.8. — Secţiune prin muşchii membrului anterior de şoarece nou-născut inoculat cu virus izolat de la un caz de boală mînă-picior-gură. Grup de fibre cu hialinizări şi necroze. Col. H.E. (*a*, ob. 40 ; *b*, ob. 90) (după Zavate şi colab., 1982)

Scanned with OKEN Scanner

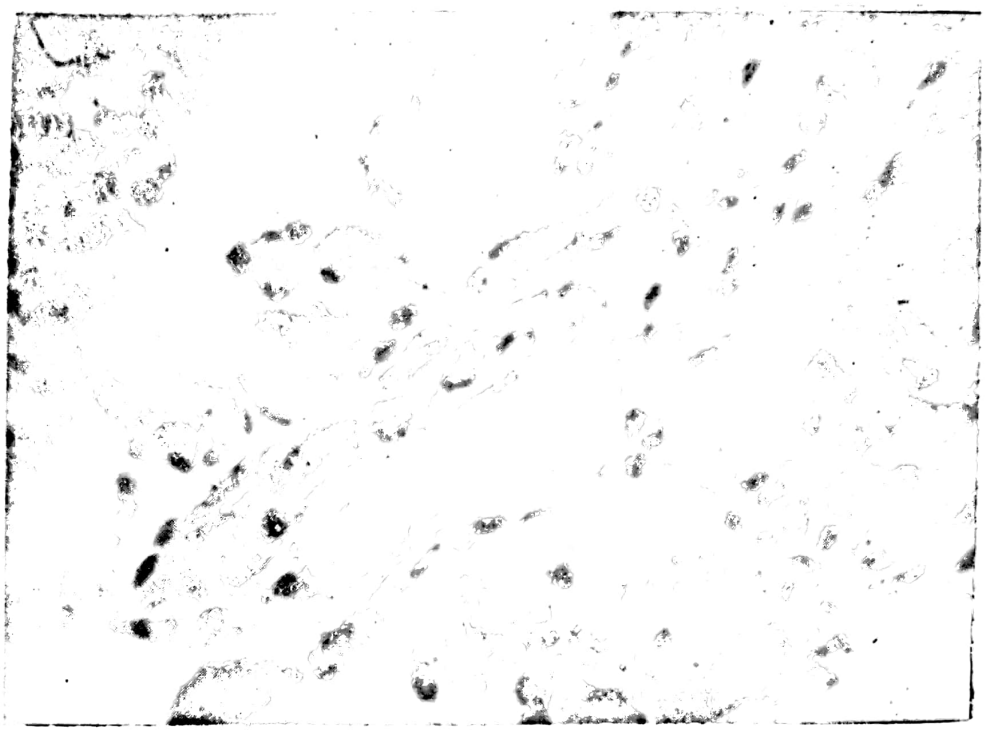


Fig. 3.9. — Secţiune prin diafragm de şoarece nou-născut inoculat cu virus izolat de la un caz de boală mînă-picior-gură. Fibre musculare cu tumefacţie, degenerare hialină, necroză. Col. H.E. Ob. 90 (după Zavate şi colab., 1982)

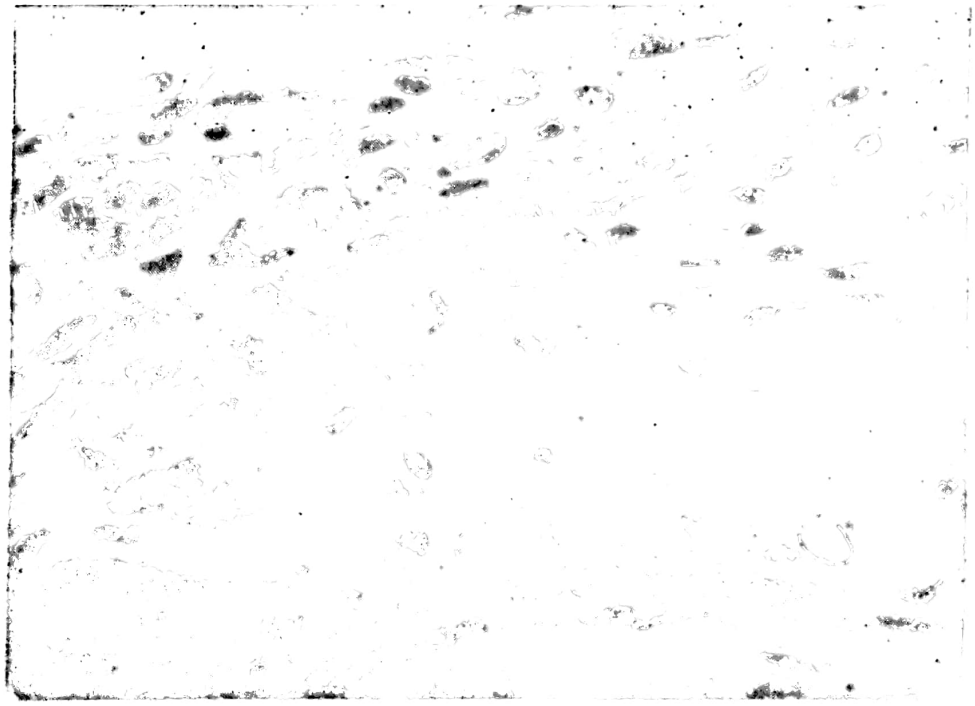


Fig. 3.10. — Secţiune prin muşchi cardiac de şoarece nou-născut inoculat cu virus izolat de la un caz de boală mînă-picior-gură. Zonă apicală cu leziuni distrofice, degenerare hialină şi necroză a miofibrilelor. Col. H.E. Ob. 90 (după Zavate şi colab., 1982)

Scanned with OKEN Scanner

interdigital şi apoi pe palme şi tălpi. Boala durează 5—8 zile. Stabilirea diagnosticului clinic implică cunoaşterea manifestărilor bolii de către medicii de mai multe specialităţi: infecţionişti, ORL-işti, dermatologi

Tabelul 3.10

Îmbolnăviri prin boală mînă-picior-gură descrise în literatura de specialitate după anul 1970

Ţara	Autori	Tip antigenic de enterovirus
S.U.A.	Adler şi colab., 1970 Hugues şi Roberts, 1972 Blomberg şi colab., 1974 Baker şi Phillips, 1979	Coxsackie A16 „ A9 EV71 Coxsackie A7
Japonia	Matsuo şi colab., 1971 Tagaya şi Moritsugu, 1973 Hagiwara şi colab., 1978 Ishimaru şi colab., 1980	Coxsackie A16 „ A16 EV71 EV71
Noua Zeelandă	Seddon şi Duff, 1971	Coxsackie A16 „ A5 „ A10
India	Morgante şi colab., 1972	Coxsackie A16
Australia	Meher-Hamji şi colab., 1973 Ellis şi colab., 1973	Coxsackie A6 „ A16
R. F. Germania	Lindenbaum şi colab., 1975	Coxsackie B2 „ B5
Franţa	Freymuth şi colab., 1980	„ A16
România	Brauner şi colab., 1981 Zavate şi colab., 1982	EV71 ?

şi stomatologi (Mc Kinney, 1975), la care s-ar putea, eventual, adresa pacienţii respectivi, exactitatea diagnosticului depinzînd de solicitarea la timp a examenelor virusologice şi serologice.

Într-o primă perioadă, enterovirusul aproape specific implicat în această îmbolnăvire a fost virusul Coxsackie A16. Ulterior, s-au mai adăugat şi alte tipuri antigenice (tabelul 3.10) dintre care cel mai important este EV71, remarcat prin frecvenţa complicaţiilor la nivelul SNC (Ishimaru şi colab., 1980). Enterovirusurile menţionate au fost izolate din fecale, exsudat faringian dar şi din lichidul vezicular. Examenele virusologice au fost confirmate de rezultatele serologice (Morgante şi colab., 1972; Ellis şi colab., 1973; Meher-Homji şi colab., 1973; Lindenbaum şi colab. 1975).

În ţara noastră, primul caz de boală mînă-picior-gură a fost descris de Brauner şi colab. (1981) şi Zavate şi colab. (1982).

A fost izolat un agent viral cu caracter de enterovirus şi care a determinat leziuni caracteristice în muşchii scheletici, diafragm şi muşchiul cardiac la şoarecele nou-născut (fig. 3.8—3.10).

Scanned with OKEN Scanner

3.3.5. BOLI RESPIRATORII

În stadiul actual, rolul enterovirusurilor nepoliomielitice în etiologia unor infecţii respiratorii acute este bine demonstrat atît prin investigaţii etio-epidemiologice cît şi prin reproducerea bolii la voluntari. Totuşi, aşa cum reiese dintr-o punere la punct a datelor din literatura de specialitate (Nicolas şi Huraux, 1976), a rămas încă neclară ponderea pe care o reprezintă această etiologie în ansamblul infecţiilor respiratorii acute de origine virală.

Aşa cum este cunoscut, infecţiile respiratorii acute pot fi determinate de virusurile gripale, paragripale, virusul sinciţial respirator, coronavirusuri, enterovirusuri, rinovirusuri, adenovirusuri şi micoplasme. Numărul tipurilor antigenice aparţinînd acestor virusuri implicate în îmbolnăvirile respiratorii, raportate la numărul total al acestora, precum şi sindroamele clinice determinate sînt redate după Krugman şi colab. (1977) în tabelul 3.11.

Tabelul 3.11

Agenţi etiologici virali în bolile acute ale tractului respirator la om (Krugman şi colab., 1977)

Agenţi virali	Serotipuri		Sindroame clinice în ordinea importanţei
	Nr. total	Nr. în boli respiratorii	
Virus sinciţial respirator	1	1	Bronşite, pneumonie, bronşiolite, infecţii ale căilor respiratorii superioare
Virus paragripal	4	4	Gripă, bronşită, bronşiolită, pneumonie
Virus gripal	3	2	Gripă, crup, infecţii ale căilor respiratorii superioare
Coronavirusuri	3+	3	Guturaiul comun la adult
Virusuri Coxsackie A şi B	29	multe	Faringite febrile (crup la copii), guturaiul comun la recruţi
Virusuri ECHO	30+	multe	Rinofaringite, guturaiul comun
Rinovirusuri	100+	100+	Guturai comun
Adenovirusuri	33	multe	Boli ale căilor respiratorii superioare şi inferioare la copii, adolescenţi şi recruţi
Micoplasma	6	1	Pneumonie la copil şi adult tînăr

În ceea ce priveşte ponderea etiologiei enterovirale, în unele studii se apreciază că aceasta reprezintă aproximativ 15—20 şi chiar 50—70% din totalul îmbolnăvirilor prin infecţii respiratorii acute, estivale în special, în timp ce în alte investigaţii proporţiile raportate au fost mult mai reduse, sub 10%.

După Grist şi colab. (1978), din rapoartele Consiliului de studii medicale şi ale Laboratorului de sănătate publică asupra bolilor respiratorii acute, reiese că în Anglia enterovirusurile au doar o mică contribuţie la totalitatea bolilor respiratorii.

Scanned with OKEN Scanner

Infecţiile respiratorii acute de origine enterovirală afectează în general căile respiratorii superioare şi mult mai rar pe cele inferioare, tipurile antigenice implicate făcînd parte din toate grupele de enterovirusuri nepoliomielitice. Din subgrupul Coxsackie A, tipurile A2, A10, A24 şi, în special, A21 au dat naştere mai multor epidemii importante în colectivităţi de copii şi militare.

Virusurile Coxsackie B au fost implicate în unele epidemii semnalate în taberele de vară sau în creşe şi în cazuri sporadice (Hierholzer şi colab., 1972; Schiff, 1979).

Din grupul virusurilor ECHO au fost asociate cu infecţii respiratorii curente tipurile 1, 11, 19 şi 25 (Henigst, 1975; Reznik şi colab., 1981, Horobowska-Marzek şi colab., 1980).

În ţara noastră, asocierea dintre enterovirusuri şi infecţiile respiratorii acute a fost semnalată de mai mulţi cercetători (Bruckner şi colab., 1964; Cajal şi colab., 1971; Cajal şi Surdan, 1971).

Cotor şi colab. (1978) au luat în studiu etiologia enterovirală a 123 de cazuri de infecţii respiratorii acute (rinofaringite, pneumonii interstiţiale, bronşite) la copii sub 1 an, internaţi în sezon estival (iunie-august) într-un spital clinic de pediatrie. Au fost izolate virusuri Coxsackie de la 39 de copii (31,7%) dintre care la 33 (26,8%) virusul Coxsackie B2 şi la 6 (4,9%) virusul Coxsackie B4. La copiii la care s-a izolat virusul Coxsackie B2, apariţia sau creşterea semnificativă a titrului anticorpilor a fost pusă în evidenţă în toate cazurile cercetate, în timp ce pentru virusul Coxsackie B4 rezultatele — cu o singură excepţie — au fost negative (tabelul 3.12).

Tabelul 3.12

Rezultatele examenelor serologice la copiii de la care s-a izolat virusul Coxsackie B2 (Cotor şi colab., 1978).

Bolnav	Anticorpi Coxsackie B2		Anticorpi Coxsackie B4	
	ser I	ser II	ser I	ser II
B.C.	1/10	1/1280	0	0
B.Cr.	1/40	1/640	0	0
C.M.	0	1/640	0	0
D.G.	1/5	1/640	0	0
E.T.	0	1/1280	0	0
G.M.	1/5	1/160	0	0
J.M.	0	1/1280	0	1/40
J.F.	0	1/320	0	0
P.M.	0	1/1280	0	0
T.I.	1/10	1/1280	0	0

Autorii menţionează că, în aceeaşi perioadă de timp, în teritoriu au fost semnalate numeroase cazuri de meningită virală, determinate de aceleaşi tipuri antigenice de enterovirusuri, ceea ce sugerează că îmbolnăvirile cu infecţii respiratorii constituie de fapt o verigă a unui proces epidemiologic unic care s-a reflectat în patologia infantilă simultan sub

Scanned with OKEN Scanner

diferite aspecte clinice (fig. 3.11), fapt semnalat şi de alţi cercetători ca fiind caracteristic pentru enteroviroze dar adesea ignorat de reţeaua medicală de pediatrie (Vâţă şi colab., 1980).

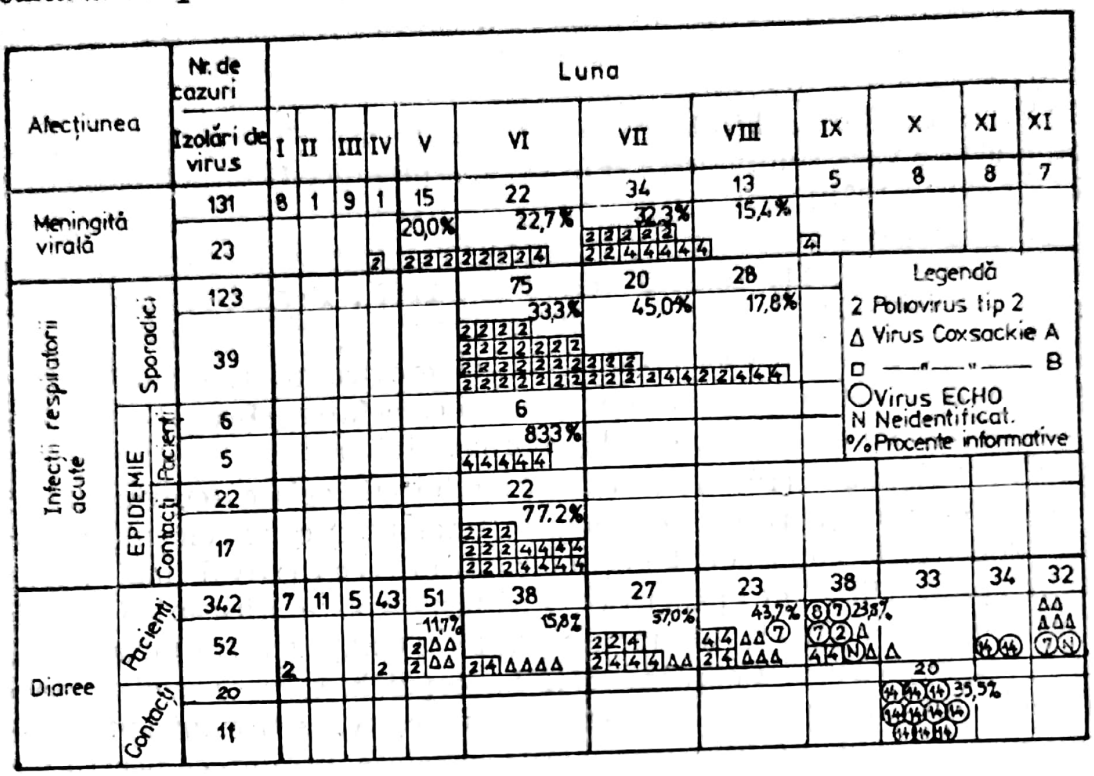


Fig. 3.11. — Poliomorfismul manifestărilor clinice ale infecţiilor cu virus Coxsackie B2 şi B4 în oraşul *I* în anul 1976 (după Vâţă şi colab., 1976a).

3.3.6. BOLI OCULARE

Conjunctivitele pot fi determinate de o serie de virusuri sau pot constitui un simptom asociat unor manifestări clinice (meningite, meningoencefalite etc.) determinate de enterovirusuri nepoliomielitice (Cajal şi Pascu, 1956; Ciugarin şi colab., 1968).

Conjuctivita enterovirală, ca sindrom de sine stătător, a fost semnalată pentru prima dată de oftalmologul ghanez Chatterjee (1970) care, împreună cu colaboratorii săi a descris un focar de conjunctivită hemoragică acută (CHA), denumită atunci boala Apollo 11, din cauza coincidenţei apariţiei ei cu lansarea navei cosmice omonime. În următorii 2 ani boala s-a extins rapid, luînd aspectul unei adevărate pandemii care a cuprins şi alte ţări din Africa şi din Asia: Thailanda, Malaysia (60 000 de cazuri în zona Singapore), Indonezia, Japonia şi apoi din Europa unde boala s-a semnalat la Moscova şi la Londra în 1971 şi în Iugoslavia şi Franţa în 1973 (Yin-Murphy şi Lim, 1972; Dumavibhat şi colab., 1973; Thongcharoen şi colab., 1974). În ciuda legăturilor rapide de transport cu zonele endemice, în Australia şi în cele două Americi nu s-au semnalat pînă în prezent cazuri de CHA.

Boala se manifestă sub formă de hemoragie subconjunctivală mergînd de la peteşii localizate pînă la mari sufuziuni hemoragice care acoperă în totalitate conjunctiva oculară. Atingerea corneei constă dintr-o cheratită epitelială tranzitorie care se vindecă cel mai adesea fără să lase opacifieri. Prognosticul CHA este de obicei favorabil. Complicaţiile neurolo-

Scanned with OKEN Scanner

gice, cu paralizii moto are pseudopoliomielitice, au fost prezente doar în unele epidemii (Bharucha şi Mondkar, 1972; Kono şi colab., 1977). Afecţiunea este extrem de contagioasă în mediu suprapopulat şi cu nivel igienic scăzut şi se propagă la fel de rapid ca şi gripa. Perioada de incubaţie este scurtă, de aproximativ 24 de ore.

Tipurile antigenice de enterovirusuri implicate cel mai frecvent în etiologia CHA au fost EV70 şi virusul Coxsackie A24. EV70, izolat pentru prima dată de pe conjunctivă în epidemiile din Thailanda, prezenta caractristici fizicochimice de enterovirus dar nu era neutralizat de serurile anti cunoscute. El a fost clasat de centrele de referinţă OMS ca un nou enterovirus şi a fost notat cu EV70.

Spre a deosebi conjunctivitele determinate de enterovirusuri de cele adenovirale, s-a propus înlocuirea denumirii de CHA cu cea de „conjunctivită epidemică picornavirală" (Grist şi colab., 1978).

Repetarea epidemiilor, în special în Asia de Sud-Est, la interval de 5 ani, sugerează că imunitatea faţă de această boală este de scurtă durată (Grist şi colab., 1978). Examenele serologice concludente, efectuate la bolnavi, au adus dovada rolului etiologic al acestui enterovirus în CHA. Totuşi, a rămas încă necunoscut sediul de multiplicare a EV70. Izolarea sa de pe conjunctivă indică acest ţesut drept locul principal de multiplicare, dar nu singurul, deoarece virusul a putut fi izolat ocazional şi din materiile fecale sau exsudatul faringian (Grist şi colab., 1978).

Virusul Coxsackie A24 a fost incriminat ca agent etiologic al epidemiilor din Singapore (1970) şi Hong Kong (1971), pe baza izolării virusului de pe conjunctivă şi a conversiei serologice prezente la pacienţii afectaţi.

Thongcharoen şi colab. (1978) au arătat că focarele de CHA din Bangkok (Thailanda), zonă în care boala are o răspîndire largă, au fost determinate de EV70 în anii 1971 şi 1974 şi de virusul Coxsackie A24 în anul 1975. Totuşi, studii serologice efectuate după anul 1975 au arătat că mai sînt încă multe persoane susceptibile atît faţă de virusul Coxsackie A24 cît şi faţă de EV70.

În unele boli ale ochiului au mai fost izolate de pe conjunctivă şi alte tipuri antigenice menţionate în tabelul 3.5. Astfel, a fost izolat virusul Coxsackie B2 de la un caz de conjunctivită chistică cronică, ECHO tip 11 după o infecţie accidentală de laborator, ECHO tip 7 la pacienţi cu meningoencefalită (Sandelin şi colab., 1977; Grist şi colab., 1978).

3.3.7. BOLI ALE APARATULUI DIGESTIV

3.3.7.1. *Boala diareică.* Într-o primă etapă, s-a presupus că enterovirusurile nepoliomielitice ar juca un rol important în etiologia bolii diareice, ceea ce a declanşat numeroase cercetări pe tot globul dintre care unele au raportat o frecvenţă mai mare de izolări la bolnavi în comparaţie cu grupe martor, în timp ce altele nu au relevat diferenţe semnificative între cele două grupe, motiv pentru care nici pînă în prezent nu s-a putut stabili o relaţie netă între enterovirusurile nepoliomielitice şi boala diareică. Inoculările pe voluntari nu au dus nici ele întodeauna la reproducerea bolii.

În unele pusee epidemice au fost implicate virusurile ECHO (tipurile 7, 11, 14, 18 şi 19) şi, mai rar, virusuri Coxsackie. Se apreciază, însă, că în aceste investigaţii nu a fost înlăturată etiologia determinată de alţi agenţi virali nedetectabili prin inoculările pe culturi celulare sau pe şoa-

Scanned with OKEN Scanner

rece sugar, cum ar fi cei din grupul rotavirusurilor, care ar fi putut fi evidenţiate doar prin microscopie electronică şi care sînt implicate astăzi cel mai frecvent în boala diareică (Ivan şi Zavate, 1977; * * * 1980). După Denoyel (1981), virusurile care infectează tractul digestiv al omului pot face parte din două categorii. Virusurile din prima categorie, din care fac parte enterovirusurile, se multiplică în intestin şi apoi se răspîndesc prin circulaţia sanguină afectînd alte ţesături şi mai rar intestinul. Diareea rămîne totuşi ca simptom principal în numeroase alte manifestări clinice determinate de enterovirusuri, ca meningitele virale, mialgia epidemică, infecţii respiratorii etc. Cele din a doua categorie, avînd ca reprezentant rotavirusurile, se înmulţesc în tractul intestinal şi constituie cauza primară şi principală a bolii diareice virale.

În ţara noastră, investigaţii asupra etiologiei enterovirale a cazurilor de boală diareică s-au efectuat începînd din anul 1963—1964 (Wisner şi colab., 1963; Leonescu şi colab., 1965; Solomon şi colab., 1968).

O formă particulară de boală, „voma epidemică", a fost descrisă pentru prima dată în ţara noastră de Zavate şi colab. (1976a) şi se manifesta prin vomă şi diaree survenite într-un episod epidemic printre copiii şi adulţii dintr-o localitate rurală din judeţul Vrancea. Îmbolnăvirile au simulat o toxiinfecţie alimentară dar examenele bacteriologice repetate au fost negative. Examenele serologice pentru leptospiroză, tifos exantematic, bruceloză şi malarie au fost de asemenea negative. În schimb, examenele virusologice pe 33 de probe de materii fecale au permis izolarea a 6 tulpini de virus Coxsackie A9.

În etiologia bolii diareice a mai fost emisă ipoteza acţiunii sinergice virus-bacterie. Astfel, în infecţia enterovirală, considerată condiţionat patogenă (Cajal şi colab., 1972), forma subclinică poate deveni clinic manifestă prin intervenţia unor factori favorizanţi, dintre care infecţiile bacteriene sînt cele mai importante. Se pretinde că în infecţiile intestinale, ca şi în cele ale tractului respirator sau ale rinichiului, un virus poate să activeze o bacterie sau se poate produce o creştere reciprocă a puterii lor patogene (Folianţ şi Mahmudova, 1971; Zavate şi colab., 1971 c, 1973b; Gutorova şi colab., 1981).

3.3.7.2. *Hepatita.* De-a lungul timpului, în etiologia hepatitei virale au fost incriminaţi diferiţi agenţi virali (reovirusuri, virusul citomegalic, adenovirus, virusul herpetic), precum şi virusurile Coxsackie şi ECHO. Enterovirusurile nepoliomielitice au mai fost implicate în hepatitele necrotice fulminante în perioada perinatală (Lansky şi colab., 1979; Gitlin şi colab., 1980). În anul 1979, Schultz şi Weiss au raportat rezultatele examenelor virusologice şi serologice obţinute la bolnavii dintr-un focar descris în Lynchburg. Din materiile fecale a fost izolat un virus cu caractere de picornavirus şi care a fost notat convenţional cu LFV (*Lynchburg fecal virus*). Acesta se înrudea antigenic cu virusul Coxsackie A24. Examenele serologice efectuate în paralel pentru LFV şi virusul hepatitei A au relevat o dezvoltare simultană a anticorpilor faţă de aceste două virusuri. Se discută ipoteza unei interacţiuni a acestora în declanşarea sindromului icteric şi necesitatea continuării studiilor în această direcţie. În general însă, relaţia enterovirusurilor cu hepatita este cît se poate de îndoielnică, prezenţa lor la un bolnav cu icter putînd fi considerată ca întîmplătoare.

3.3.7.3. *Pancreatita.* Cîteva observaţii sugerează că virusurile Coxsackie ar putea fi implicate în determinarea unor leziuni ale pancreasului. Astfel,

Scanned with OKEN Scanner

la copiii decedaţi datorită unor infecţii generalizate cu virusuri Coxsackie B au fost găsite leziuni severe ale pancreasului, iar unele cazuri de pancreatită la adult au fost asociate — pe baza examenelor virusologice şi serologice — cu virusurile Coxsakie B3, B4 şi B5 (Grist şi colab., 1978; Ursing, 1973).

Au mai fost raportate rezultate experimentale pe şoarecele alb care pledează pentru asocierea unor tipuri de enterovirusuri cu pancreatita (Richens şi colab., 1977; Burch şi Harb, 1979a; Webb şi Madge, 1980).

După Grist şi colab. (1978), deşi pancreatita simptomatică la om este evident o complicaţie foarte rară a infecţiei cu virus Coxsackie, extrapolînd rezultatele obţinute pe animale se presupune că acesta poate reprezenta un factor declanşator al dezvoltării ulterioare a diabetului la persoane predispuse genetic.

3.3.7.4. *Diabetul zaharat.* Asocierea dintre diabet şi unele infecţii virale (herpes, vaccină etc.) a fost studiată încă din anul 1951 şi apoi în cercetări ulterioare în cadrul Institutului de virusologie Bucureşti (Balmuş şi Cajal, 1951; Cajal, 1975). În ceea ce priveşte enterovirusurile în ultimii ani, o serie de cercetări au sugerat o posibilă asociere dintre diabetul zaharat juvenil dependent de insulină şi infecţia prin virusuri din grupul Coxsackie B, tipul B4 în special. Aceste studii au constat fie din încercări de izolare a virusului la bolnavi cu diabet, fie din evidenţierea diabetului la copii cu infecţii cu Coxsackie, fie, în sfîrşit, din cercetarea anticorpilor faţă de virusul Coxsakie B la pacienţi cu diabet, în comparaţie cu grupe martor.

Izolarea unei variante de virus Coxsackie B4 din ţesutul pancreatic de la un caz letal de comă diabetică, prin inocularea pe culturi celulare de rinichi de maimuţă şi pe voluntari, a fost raportată de Mangh (1979). Acest virus a determinat la şoarece diabet şi a fost reizolat din organele acestuia. Champsaur şi colab. (1980) au izolat, la rîndul lor, din fecalele unui copil cu diabet zaharat ca manifestare secundară a infecţiei virale, virusul Coxsackie B5, demonstrînd şi o conversie serologică semnificativă.

O serie de studii seroepidemiologice au dat şi ele rezultate pozitive, cum ar fi cele ale lui Hazra şi colab. (1980) care au raportat îmbolnăviri de diabet cu aspect sezonier, la un grup de copii de 10—19 ani avînd examene serologice pozitive pentru virusul Coxsackie B4 într-o proporţie de 87 %. Dimpotrivă, alţi cercetători nu au reuşit prin studii seroepidemiologice să stabilească vreo corelaţie dintre diabet şi virusurile Coxsackie (Walces, 1973; Madden şi colab., 1978).

Experimental, afectarea întîrziată a celulelor pancreatice (insulele lui Langerhans) şi prezenţa anticorpilor la titruri ridicate în infecţia cu virus Coxsackie B4 a fost dovedită de mai mulţi cercetători (Loria şi colab., 1976; Webb şi Madge, 1980).

În concluzie, deşi unele observaţii sugerează o asociere între diabetul zaharat juvenil şi infecţiile cu virus Coxsackie (B4), dovezi opuse impun continuarea studiilor epidemiologice şi virusologice. În cazul în care asocierea se va confirma, s-a propus prepararea unui vaccin faţă de acest tip antigenic pentru a proteja tinerii faţă de îmbolnăvirea prin diabet juvenil (Mangh, 1979).

3.3.8. BOLI FETALE ŞI LA NOU-NĂSCUŢI

Infecţii antenatale şi embriopatii. Ca şi în alte viroze, pentru care în Institutul de virusologie Bucureşti au existat preocupări de-a lungul timpului (Cajal şi Surdan, 1969; Copelovici şi colab., 1978; Cajal, 1979; Cajal şi

Scanned with OKEN Scanner

colab., 1980 a, b), infecţiile enterovirale, cu stare de viremie în perioada de sarcină la mamă, pot afecta fătul, determinînd anomalii congenitale şi/sau moarte subită (Freedman, 1979; Baker şi Phillips, 1980). Efectul teratogen al enterovirusurilor, totuşi, nu este încă bine cunoscut fiind necesare în continuare studii în acest domeniu (Brown şi Karunas, 1972; Grist şi colab., 1978).

Cele mai frecvente anomalii congenitale atribuite enterovirusurilor, din grupul Coxsackie B în special, sînt anomaliile de cord. Enterovirusurile au mai fost asociate de către Brown şi Karunas (1972), Hannson şi colab. (1975) cu anomalii urogenitale (Coxsackie B3 şi B4), ale aparatului digestiv (Coxsackie A9), ale aparatului musculoosos şi ale sistemului nervos (EV71). Enterovirusurile implicate cel mai frecvent au fost toate tipurile antigenice de virusuri Coxsackie B şi mai rar virusurile ECHO tip 11 (Freedman, 1979), tip 9 (Grist şi colab., 1978), EV71 (Hannson şi colab., 1975). Implicarea enterovirusurilor în etiologia unor anomalii congenitale se bazează pe de o parte pe dovezi virusologice şi serologice şi, pe de altă parte, pe dovezi experimentale.

Dovezile virusologice constau din izolarea enterovirusurilor din produse patologice de la mamă şi de la făt. Astfel, Mata şi colab. (1977) au izolat din 194 de probe de meconium şi fecale de la copii în primele 3 zile de viaţă 10 tulpini de enterovirusuri (tabelul 3.13).

Tabelul 3.13

Enterovirusuri izolate din meconium sau fecale de la copii în primele 3 zile de viaţă (Mata şi colab., 1977)

Zi de viaţă	Nr. copii	Rezultate +		Tipuri antigenice
		nr.	%	
1	79	1	1,3	E7
2	54	4	7,4	P1, E6, E6, E6
3	61	5	8,2	P1+E6, E6, E7, E9, E11

P = poliovirus; E = virus ECHO

Hughes şi colab. (1972) au izolat virusul ECHO tip 14 din ţesutul hepatic, iar Wilterdinck şi colab. (1971) virusul Coxsackie tip A9 din ţesutul cardiac al fătului. În unele cazuri, concomitent cu izolarea virusului s-a demonstrat conversia serologică semnificativă.

Serologic s-a demonstrat o frecvenţă mai mare a anticorpilor faţă de unele tipuri antigenice de enterovirusuri la nou-născuţi cu malformaţii congenitale ale cordului sau la mamele acestora, în comparaţie cu grupe-martor (Lerner şi Wilson, 1973).

În ceea ce priveşte moartea fătului, aceasta apare probabil atunci cînd infecţia mamei a avut loc în perioade tîrzii ale sarcinii, dezvoltarea *in utero* a embrionului nefiind influenţată dar în schimb incompatibilă cu viaţa postnatală (Ciugarin-Brăiloiu, 1973; Plöchl şi colab., 1976). Asocierea enterovirusurilor cu moartea fetală s-a bazat pe izolarea acestora din ţesuturile fetale într-o frecvenţă crescută, pe rezultate serologice şi anchete epidemiologice.

Moartea fetală a fost atribuită de diferiţi cercetători virusurilor ECHO tip 19, ECHO tip 10, 21 şi 22, virusurilor Coxsackie B3 (Lerner şi Wilson, 1973), Coxsackie A9 (Wilterdink şi colab., 1971) ş.a.

Scanned with OKEN Scanner

Implicarea enterovirusurilor în anomaliile congenitale a fost demonstrată şi experimental pe şoarece pentru virusul Coxsackie B4 (Marinescu şi Demetrescu, 1969), Coxsackie B3 şi A9 (Soloviev şi colab., 1970), Coxsackie A5 (Copelovici şi colab., 1970) etc.

Infecţii perinatale şi neonatale. În literatura de specialitate au fost descrise relativ numeroase îmbolnăviri sporadice sau grupate în unităţi spitaliceşti printre nou-născuţi în primele zile de viaţă (Bell şi Grist, 1971; Lapinleimu şi Kaski, 1972; Hasegawa, 1975; De Backer şi colab., 1976; Merthens şi colab., 1980). S-a semnalat caracterul nozocomial şi sezonier al îmbolnăvirilor (Morens, 1978; Grist şi colab., 1978).

În multe cazuri a fost dificil de apreciat dacă infecţia s-a produs înainte de naştere sau după, pentru această din urmă modalitate pledînd, în unele situaţii, rezultatele anchetelor epidemiologice care au stabilit ca sursă de infecţie o mamă sau un membru al personalului medicosanitar. Infecţia se poate transmite pe cale digestivă sau aeriană (Muschner şi colab., 1977; Davies şi colab., 1979).

Manifestările clinice în cadrul episoadelor menţionate au fost polimorfe. Au fost descrise infecţii grave letale în special printre copii cu prematuritate infectaţi în primele zile de viaţă (Mc Donald şi colab., 1971; Morens, 1978; Davies şi colab., 1979; Modlin, 1980), meningite şi alte îmbolnăviri uşoare, pînă la forme asimptomatice (Muschner şi colab., 1977). În cazurile letale s-au semnalat manifestări hemoragice la mai multe organe, hepatită necrotică, encefalită, miocardită, meningită, tulburări gastrointestinale sau respiratorii (Krous şi colab., 1973), herpangină (Chawareewong şi colab., 1978), stomatită (Hasegawa, 1975).

Diagnosticul etilogic al îmbolnăvirilor a fost posibil prin izolarea enterovirusurilor din fecale, SNC, LCR, muşchi cardiac, apariţia sau creşterea titrului anticorpilor şi prin excluderea altor agenţi patogeni, bacterii în special. Punerea în evidenţă a IgM mercaptan-sensibile constituie o indicaţie în plus asupra unei infecţii recente (Lerner şi Wilson, 1973). Boala natală a fost atribuită cel mai frecvent virusurilor Coxsackie B (Gear şi Measroch, 1973), mai rar celor din subgrupul A (Chawareewong şi colab., 1978), virusurilor ECHO tip 6 (Krous şi colab., 1973), tip 7 (Faulkner şi colab., 1973), tip 11 (Nagington şi colab., 1978; Stettnisch şi Stettnisch, 1979; Davies şi colab., 1979; Modlin, 1980), tip 17 (Stettnisch şi Stettnisch, 1979), tipurile 18, 19, 20 (Grist şi colab., 1978), tip 22 şi tip 31 (Mc Donald şi colab., 1971). În ţara noastră, Drăgănescu şi colab. (1980) au izolat din ţesuturi virusul Coxsackie B2 de la un copil decedat cu manifestări de meningoencefalită postnatală.

3.3.9. BOLI RENALE

Încă înainte de anul 1970, o serie de autori din străinătate şi din ţara noastră (Marinescu şi Andronescu, 1962) au descris afecţiuni renale asociate cu enterovirusuri nepoliomielitice (ECHO tip 9 şi Coxsackie B4), observaţii de acest fel fiind relatate şi mai recent (Burch şi colab., 1974; Morrisson şi Wright, 1977). Gaudin şi colab. (1979) au descris nouă cazuri de glomerulonefrită cronică progresivă (diagnosticată prin biopsie renală) la care s-a izolat virusul din urină, sînge şi, la 4 pacienţi, din materii fecale. Autorii consideră aceste infecţii ca făcînd parte din grupul infecţiilor persistente pe baza a trei categorii de fapte: virusul a fost excretat mai mult

Scanned with OKEN Scanner

de 3 luni; viremia a fost prezentă după cîteva săptămîni de la detectarea virusului în urină; virusul a fost mai frecvent izolat din urină decît din materii fecale. Nefropatii determinate de virusuri Coxsackie au fost descrise şi în ţara noastră de Topciu şi colab. (1960b).

Experimental, s-a dovedit că enterovirusurile pot provoca leziuni renale la şoareci în urma proceselor imunologice (Gaudin şi colab., 1979; Yugeta, 1980; Sato, 1980).

3.3.10. ALTE BOLI

În sfîrşit, trebuie să menţionăm cîteva studii în care enterovirusurile ECHO tip 9 şi Coxsackie B au fost asociate cu orhita (Willems şi colab., 1977), virusurile Coxsackie B3 cu parotidita (Bertaggia şi colab., 1976), iar virusul Coxsackie B cu sindromul hemolitic uremic (Ray şi colab., 1971; Austin şi Ray, 1973).

BIBLIOGRAFIE

ABRAHAM A. A., CHEEVER F. S. (1979), *Enterovirus infection in a semiclosed community*, Med. Microbiol. Immunol., **167**, *1*, 45–54.

AGARWAL S. K., KAPPOR A. K., MATHUR A., MEHROTRA P. M., CHATURVEDI V. C. (1973), *Prevalence of antibodies against enteroviruses in the population of Lucknow*. Indian J. med. Res., **61**, *12*, 1799–1809.

ADLER J. L., MASTOW S. R., MELLIN H., JANNEY Y. H., YOSEPH J. M. (1970), *Epidemiologic investigation of hand, foot and mouth disease. Infection caused by Coxsackie virus A16 in Baltimore, June through September 1968*, Amer. J. Dis. Child., **120**, *4*, 309–318.

ARION R., BUIMOVICI-KLEIN E., DINCULESCU M. (1968), *Virusurile Coxsackie în România. II. Cercetări imuno-serologice*, Stud. Cerc. Inframicrobiol., **19**, *5*, 333–342.

ASSAAD F., COCKBURN W. C. (1972), *Four-year study of W.H.O. virus reports on enteroviruses other than poliovirus*, Bull. W.H.O., **46**, *3*, 329–336.

AUSTIN T. W., RAY G.C. (1973), *Coxsackie virus group B infections and hemolytic-uremic sindrome*, J. Infect. Dis., **127**, *6*, 698–702.

AVRAM G., GALACTION E., ZAVATE O. (1971), *Enterovirusurile în colectivităţile de copii*. În: vol. *Travaux scientifiques de l'Institut d'hygiène et de santé publique de Iassy*, 1969–1973, p. 443.

AVRAM G., GALACTION E. (1974), *Incidenţa enterovirusurilor într-o colectivitate închisă de copii*, Pediatria, **23**, *5*, 413–418.

AYMARD M., CHASTEL C., CHOMEL I. I., GAUDFERNAU I., THOUVENO T. D. (1979), *Infections à entérovirus 71 en France*, Lyon méd., **242**, *15*, 185–188.

BABOŞ A., IONESCU N., IVANOF A. (1962), *Some remarks on Coxsackie virus infection*. În vol. : *Al III-lea Congr. Intern Path. Infect.*, 8–11 oct., Bucarest, 749–751.

BAKER D. A., PHILLIPS C. A. (1979), *Fatal hand-foot-mouth disease in a adult caused by Coxsackie virus A7*, J. Amer. Me . Ass., **242**, *10*, 1065.

BAKER D. A., PHILLIPS G. A. (1980), *Maternal and neonatal infection with Coxsackie virus*, Obstet. Gynecol., **55**, *2* suppl., 12–15.

BALL A. P. (1979), *Disease due to echovirus 19 in Birmingham, England, 1975: relationship to "epidemic neuromyasthenia"*, Postgrad. Med. J., **54**, *637*, 737–740.

BALMUS G., CAJAL N. (1951), *Research on the evolution of certain viral diseases in rabbits with experimental diabetes*, Works Inst. Inframicrobiol. (1949–1963), p. 23.

BARSON W. J., HOSIER C. J., BRAWLEY H. D., MILO H. D. (1981), *Survival following myocarditis and myocardial calcification associated with infection by Coxsackie virus B*, Pediatrics, **68**, *1*, 79–81.

BÉGUÉ P., LAPLANE R. (1975), *Méningites virales*, Rev. Prat., **25**, *9*, 619–628.

BELL E. J., GRIST N. R. (1970), *Echoviruses, carditis and acute pleurodynia*, Lancet, 7642, 326–328.

BELL E. J., GRIST N. R. (1971), *ECHO viruses, carditis and acute pleurodynia*, Amer. Heart J., **82**, *1*, 133–135.

BERTAGGIA A., MENEGHETTI P., CARRETTA M. (1976), *Osservationi su un caso de parotidite de Coxsackie-virus B3*, G. Mal. infett. parassit., **28**, *3*, 188—189.
BERTRAND J.L., PEYRMOND D., DENOYEL G. A., TENE P. (1980), *Etiologie des méningites virales (À propos d'une étude prospective de 128 cas)*, Lyon méd., **244**, 79—84.
BHARUCHA E. P., MONDKAR V. P. (1972), *Neurological complications of a new conjuctivitis*, Lancet, **II**, 970.
BLOMBERG I., LYCHE E., AHLFORS K., JOHNSSON T., WOLONTIS S., VON ZEIPEL G. (1974), *New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand, foot and mouth disease*, Lancet, **II**, *7872*, 112—114.
BOGEAROV E. F. (1980), *Porajenie serdţa pri infecţii vizavannoi virusami Coxsackie*, Vopr. Revmatizma, *3*, 59—61.
BODENSTEINER J., MORRIS H. H., HOWELL J. T. (1978), *Chronic ECHO type 5 viral meningitis in a patient with X-linked hypogammaglobulinemia: effective treatment with immune plasma infusion*, Neurology, **28**, *4*, 369.
BÖTHIG B., STARKE H. (1978), *Outbreaks and epidemics caused by several enterovirus types*. În: vol.: VIIth Intern. Congr. of Infectious and Parasitic Diseases, Rep. I, Varna, 2—6 oct., *p*, 406—409.
BÖTHIG B., STARKE G., KAMOLZ U. (1979), *Ergebnisse eines sero-epidemiologischen Surveillance des Enterovirus 71 in R.D.G.*, Dtsch. Gesundh. Wes., **34**, *38*, 1869—1879.
BRAUNER E., DĂNILĂ F., RĂDULESCU A., TURCU T., VÎNTU C., HURMUZACHE T., VATAVU C., DAMIR P., COLTEA A., BARASCU L., GAVRILIŢĂ L., LABA E., ZAVATE O., COTOR F., IVAN A. (1981), *Boala gură-mînă-picior: premieră clinică în ţara noastră*, Rev. med.-chir. Iaşi **85**, *4*, 629—634.
BRICOUT F. (1971), *Les infections à entérovirus*. În: *Maladies infectieuses*, de R. Bastin, Ed. Flammarion, Paris, p. 1389—1404.
BRISOU B. P., BRISOU J. F., BRISOU P. J., DOUBLET M. (1982), *Étude de la prévalence des entérovirus chez les enfants d'une garderie pendant trois ans*, Bordeaux méd, **15**, 339—344.
BROWN G. C., KARUNAS R. S. (1972), *Relation of congenital anomalies and maternal infection with selected enterovirus*, Amer. J. Epidemiol., **95**, *3*, 207—217.
BRUCKNER S., TEODORESCU T., LÖBEL R., LAZĂR E. (1962), *Neuroinfecţii fruste cu virusuri Coxsackie*, Viaţa med., **19**, *2*, 75—78.
BRUCKNER S., CIUGARIN M., COTARCEA S. (1964), *Considérations sur le rôle du virus ECHO type 11 dans les laryngites obstructives aiguës graves de l'enfant*, Sem. Höp., **40**, *16/4*, 998—1002.
BRUCKNER S., TAINDEL C., PREDESCU I., CIUGARIN M., ŞERBAN P. (1969), *Corelaţii etiologice în infecţiile acute cu enterovirusuri nepoliomielitice*. În: Al XII-lea Simpozion european de poliomielită şi boli înrudite, 4—7 mai, Bucureşti.
BRUCKNER S. et al. (1972), *Cercetări privind etiologia şi clinica neuroinfecţiilor acute determinate de enterovirusuri. Aspecte după aplicarea vaccinării antipoliomielitice*, Viaţa med. **19**, *10*, 449—452.
BURCH G. E., HARB J. M., HIRAMOTO Y. (1974), *Coxsackie B4 viral infection of the human kidney*, J. Urol. **112**, *6*, 714—722.
BURCH G. E., HARB J. M., HIRAMOTO Y. (1975), *Coxsackie viral infection of human myocardium*, Hum. Pathol., **6**, *1*, 120—125.
BURCH G. E., HARB J. M. (1979 a), *Electron microscopic studies of viral pancreatitis in Coxsackie B4 virus infected mice*, Exp. mol. Pathol., **31**, *1*, 23—35.
BURCH G. E., HARB J. M. (1979 b), *Lesions induced by encephalomyocarditis virus and Coxsackie virus B in newborn mice*, Arch. Pathol. Lab. Med., **103**, *7*, 348—354.
CAJAL N., PASCU M. (1956), *Conjuctival viral infection*, Works Inst. Inframicrobiol. (1949—1963), p. 33.
CAJAL N., SURDAN C. (1969), *Acţiunea teratogenă a unor infecţii inframicrobiene*, Stud. cerc. Inframicrobiol., **20**, 467.
CAJAL N. et al. (1971), *Unele probleme actuale ale infecţiilor respiratorii virale*, Stud. Cerc. Inframicrobiol., **22**, *1*, 19—32.
CAJAL N., SURDAN C. (1971), *Determinări oto-rino-laringiene în infecţiile virotice*, Oto-rino-laringol., **16**, 81.
CAJAL N., MĂGUREANU E., DANIELESCU G. (1972), *Virusuri condiţionat patogene*, Microbiol. Parazitol. Epidemiol., **17**, 39.
CAJAL N. (1975), *Some results obtained by the "Ştefan S. Nicolau" Institute of Virology in the study of herpes*. În vol.: Abstr. of Works of the "Ştefan S. Nicolau" Institute of Virology, p. 13.
CAJAL N., CERNESCU C. (1978), *Implicaţiile imunopatologice în infecţiile virale persistente*. În: Abstr. of the Works of the "Ştefan S. Nicolau" Institute of Virology, 14.
CAJAL N. (1979), *30 de ani de activitate a Institutului de virusologie "Ştefan S. Nicolau"*, Abstr. of the works of the "Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, 10—11.

Scanned with OKEN Scanner

HIERHOLZER J. C., HILLIARD K. A., ESPOSITO I. I. (1975), *Serosurvey for acute hemorrhagic conjunctivitis virus (enterovirus 70) antibodies in the southeastern United States with review of literature and some epidemiologic implications*, Amer. J. Epidem., **102**, *6*, 533–544.

HOROBOWSKA-MARZEK H., GRODZICKA-KROLAK H., WILOPOLSKA H. (1980), *Virus ECHO-11 chez les malades hospitalisés à Varsovie dans les années 1968–1977*, Pediat. Pol., **55**, 203–205.

HUGHES J. R., WILFERT C. M., MOORE M., BENIRSCHEE A., HOYOS-GUEVARA E. (1972), *ECHO virus 14 infection associated with fatal neonatal hepatic necrosis*, Amer. J. Child. Dis., **23**, *1*, 61–67.

HUGHES R. O., ROBERTS C. (1972), *Hand, foot and mouth disease associated with Coxsackie A 9 virus*, Lancet, II, *7780*, 751–757.

IONESCU-MIHĂIEŞTI C. et al, (1954), *Izolarea virusului Coxsackie din fecalele unui copil suspect de poliomielită*, Com. Acad. R.P.R., **4**, *9–10*, 537–544.

IONESCU-MIHĂIEŞTI C. et al (1959), *Etude sur la poliomyélite en Roumanie pendant les années 1957 et 1958*, Arch. roum. Pathol. Expér., **18**, *4*, 485–491.

IONESCU-MIHĂIEŞTI C. et. al (1963), *Controle de la flore virale entérale chez les enfants sains, avant et après la première campagne de vaccination poliomyélitique per orale effectuée en Roumanie*, Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **22**, *2*, 225–237.

IONESCU N., MUNTEANU I. (1965), *Contribuţii la studiul etiologiei paraliziilor faciale*. În vol. Congr. nat. Microbiol. medicală, sept., Bucureşti, p. 12.

IONESCU N., CIUPE M., SOVREA D., DIMOFTACHE E., IURAŞAG G., GAVRILĂ I. (1972), *Incidenţa enterovirusurilor în etiologia meningitelor aseptice*. În vol.: *Zilele medicale ale Sibiului*, p. 30.

ISHIMARU Y., NAKANO S., YAMAOKA K., TAKAMI S. (1980), *Outbreaks of hand, foot and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorder of central nervous system*, Arch. Dis. Child., **55**, 583–588.

IVAN A., ZAVATE O. (1977), *Actualităţi în epidemiologia şi etiologia gastroenteritelor virale*, Rev. med. – chir. Iaşi, **81**, *1*, 13–28.

IVAN A. (1981), *Sterilizarea şi dezinfecţia în controlul infecţiilor nosocomiale*, Rev. med. – chir. Iaşi, **85**, *1*, 226–232.

JDANOVSKAIA N. I., REZNIK V. I., VÎBOROVA A. E., MALIAVINA O. M., SOKUR I. V., ESAKOVA M. A. (1981), *Itoghi laboratornovo izucenia enterovirusnih seroznih meninghitov v tecenia riada let v Habrovskom krae*. În vol. Conf. *Virusi i virusnîie infecţii celoveca*, Moscova, p. 37–38.

KARTE H., WECKER T. (1978), *Epidemia s virusu ECHO 30* Dtsch. med. Wschr., **103**, *28*, 1136–1138.

KAWAMOTO H. (1979), *Antigenic analysis of acute hemorrhagic conjunctivitis viruses (enterovirus type 70)*, Microbiol. Immunol., **23**, *9*, 859–866.

KENNETT M. L., BIRCH C. I., LEWIS F. A., YUNG A. P., LOCARNINI S. A., GUST I. D. (1975), *Enterovirus type 71 infection in Melbourne*, Bull. W.H.O., **51**, *6*, 609–615.

KISELEVA M. V., PETROV B. V., BERDYLIEV O. M. (1972), *Isolation of Coxsackie A viruses from intestinal tract of house mice*, Vopr. Virusol., *6*, 713–717.

KOGUT E. P., LOZOVSKAIA L. S., JERDEEVA A. I., SUVALOVA I. A., LESNIH K. A. HAICENKO T. M., ŞIŞMAREVA N. G. (1981), *Persistenţia virusa Coxsackie A13 v smeiah bolnih reumocarditom detei*, Vopr. Virusol. *4*, 446–452.

KONO R., MIYAMURA K., TAJIRI E., SASAGAWA A., PHUAPRADIT P., ROONGWITHU N., VEJJAJIVA A., IAYAVASU C., THONGCHAROEN P., WASI C., RODPRASSERT P. (1977), *Virological and serological studies of neurological complications of acute hemorrhagic conjunctivitis in Thailand*, J. infec. Dis., **135**, *5*, 706–713.

KROUS H. F., DIETZMAN D., RAY C. G. (1973), *Fatal infection with Echovirus types 6 and 11 in early infancy*, Amer J. Dis. Child., **126**, *6*, 842–846.

KRUGMAN S., WARD R., KATZ S. L. (1977), *Infectious diseases of children*, The C V. Mossby Company, Saint Louis, pp. 48–61; 149–154; 223–245.

KUWERT E. K., THRAENHART O. (1977), *Theoretische, methodische und praktische Probleme der Virusdesinfektion in der human Medizin*, Immun. Infek., **5**, *4*, 125–137.

LANSKY L. L., KRUGMAN S., HUG G. (1979), *Anicteric Coxsackie B hepatitis*, J. Pediat. **94**, *1*, 64–65.

LAPINLEIMU K., KASKI U. (1972), *An outbreak caused by Coxsackie virus B5 among newborn infants*, Scand. J. Infect. Dis., **4**, *1*, 27–31.

LAVROVA I. K., NOVIKOV I. I., STULOVA M. A. (1981), *Serologhiceschie docazatelstva roli virusov Coxsackie v serdecinososudistoi patologhii celoveca*. In vol. Conferinţei *Virusi i virusnîie infecţii celoveca*, Moscova, p. 21.

LEONESCU M., CIUGARIN M., MARCOVICI A. (1965), *Izbucnire familială de diree infantilă, cu izolare de virus ECHO (tip 14)*, Pediatria, **14**, *2*, 149–156.

Scanned with OKEN Scanner

ZAVATE O., GALACTION E., AVRAM G., GHIBU F., VIRNA G., BÎRZU N., IRINESCU A. (1971 a), *Entérovirus non-poliomyélitiques dans la masse de la population et chez les sujets malades*, XIIIe Symposium européen de la poliomyélite et autres maladies à virus, Helsinki, 1—4 juin.

ZAVATE O., AVRAM G., BÎRZU N., GALACTION E., VIRNA G. (1971b), *Virusurile ECHO în masa populației și la bolnavi*, Rev. med.-chir. Iași, **75**, *1*, 111—117.

ZAVATE O., BURDEA O., BÎRZU N., BLÎNDU P., BEȘLEAGĂ V., TUDORANU A., VIRNA G., BALAȘIU S. (1971c), *Enterovirusurile în boala diareică a copiilor*. În vol.: Al II-lea Congr. naț. Microbiol. Med., București, 15—17 sept., 126.

ZAVATE O., GALACTION E., AVRAM G., VIRNA G., BÎRZU N., IRINESCU A. (1971d), *Enterovirus non-poliomyélitiques dans la masse de la population et chez les sujets malades*. În vol.: *Traveaux scientifiques de l'Institut d'Hygiène et de Santé Publique de Iassy*, 1969—1973, p. 443.

ZAVATE O., GALACTION E., AVRAM G., BÎRZU N., VIRNA G., IRINESCU A. (1973a), *Potential épidemiologique des entérovirus en Moldavie*, Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **32**, *4*, 593—602.

ZAVATE O., BLÎNDU P., BEȘLEAGĂ V., CIMUT N. (1973b), *Mixed viral-bacterial infection in the diarrheic disease*. In vol. Simpoz. *Polioparazitismul la om și animale*, Piatra Neamț, 29—30 noiembrie, p. 20.

ZAVATE O., IVAN A., AVRAM G., COTOR F., VASILIU I., IRINESCU A. (1976a), *Enteroviral etiology of some epidémic outbreaks in a zone of Romania*, Rev. roum. Med. Virol., **27**, *1*, 55—59.

ZAVATE O., COTOR F., IVAN A. (1976b), *Epidemic outbreak of Coxsackie virus meningitis. Note II. Virological and serological investigations*, Rev. roum. Med. Virol., **27**, *4*, 284—292.

ZAVATE O., COTOR F., IVAN A., TIRON S., AVRAM G. (1980), *Investigations of the circulation of enteroviruses in a children community*, Rev. roum. Med. Virol., **31**, *4*, 289—293.

ZAVATE O., COTOR F., IVAN A., AVRAM G., VIRNA G. (1981), *Evaluarea potențialului epidemiologic al purtătorilor de enterovirusuri în mediul spitalicesc*, Rev. med.-chir. Iași, **85**, *1*, 234—235.

ZAVATE O., AVRAM G., COTOR F., DOLINESCU S., MIHĂILĂ M. (1982), *Enterovirus isolation from a case of hand, foot and mouth disease reported in Romania*, Rev. roum. Med. Virol., **33**, *4*, 303—304.

ZAVATE O., AVRAM G., PAVLOV E., BURLEA-IRICIUC A., COTOR F. (1983), *Angine herpetiforme cu virusuri Coxsackie grup A*. În: Vol. Rez. Ses. șt. I.I.S.P. Iași, 11—12 febr. p. 79.

ZELLER H., COULANGES P. (1980), *Les enterovirus à Madagascar. Bilan de vingt ans d'activité du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur du Madagascar*, Arch. Inst. Pasteur Madagascar, **47**, *1*, 121—169.

ZEPPA M. P. (1970), *Gli anticorpi neutralizanti l'ECHO 9 nella populatione umbra*, Ann. sclavo., **12**, *2*, 142—150.

* * * (1973), *Encephalitis, Neurotropic viral disease, CDC*, Annual encephalitis summary, 1971, 1—23.

* * * (1980), *Rotavirus and other viral diarrheas*, Bull. O.M.S., *58*, 183—198.

* * * (1982a), *Surveillance des maladies à enterovirus. Coxsackie A 16*, Relevé epidém., hebd., **57**, *20*, 153.

* * * (1982b), *Surveillance des maladies à enterovirus*, ECHO *type 25*, Relevé épidém. hebd., 4, 31.

Scanned with OKEN Scanner

DIAGNOSTIC DE LABORATOR

În cadrul acestui capitol vom face doar o scurtă trecere în revistă a principiilor metodelor de diagnostic de laborator intrate în uz curent pentru enterovirusuri, cele aflate în stadiu de cercetare sau utilizare pentru studii virusologice fundamentale fiind pomenite în capitolul 2. În ceea ce privește tehnicile de lucru, ele pot fi consultate în manuale de specialitate (Cajal, 1958; Gaudin 1964; Alexandrescu, 1973; Voiculescu, 1976) și în articole de sinteză consacrate interpretării rezultatelor obținute (Cajal, 1960; Sohier și Gaudin, 1978; Voiculescu și Schöffend, 1978; Strati și Cajal, 1980; Baumgarten, 1980). După ce vom aminti cîteva probleme legate de prelevarea, transportul și prelucrarea produselor patologice, vom trece succint în revistă metodele convenționale de diagnostic de laborator în enterovirozele nepoliomielitice și apoi metodele rapide care, în ultimii ani, au luat o mare extindere. În încheierea capitolului vom reveni asupra valorii criteriilor de diagnostic de laborator și asupra interpretării rezultatelor obținute.

4.1. PRELEVAREA, TRANSPORTUL ȘI PRELUCRAREA PRODUSELOR PATOLOGICE

Pentru diagnosticul etiologic al unei îmbolnăviri enterovirale se va urmări izolarea virusului din produsele patologice ale bolnavului, recoltate de preferință în primele zile de boală, ținîndu-se seama totodată că durata de excreție este relativ îndelungată și deci virusul poate fi izolat chiar timp de mai multe săptămîni.

Bateria de produse patologice ce urmează a fi examinată aproape pentru toate formele clinice de boală constă din: 3 probe de materii fecale recoltate trei zile consecutiv pentru a se mări șansele de izolare; 1—2 probe de exsudat faringian; 1—2 probe de lichid cefalorahidian, o probă de sînge, a cărei cheag broaiat se va inocula, iar serul va constitui proba I (precoce) pentru examen serologic; a doua probă de sînge, pentru obținerea serului II (tardiv), va fi recoltată cel puțin după 14—21 de zile de la debut, pentru a se pune în evidență conversia serologică.

În plus, în diferite alte manifestări clinice vor mai fi recoltate probe de pe leziunile specifice sindromului respectiv, cum ar fi lichid din vezicule sau elemente cutanate, lichid conjunctival, fragmente de organe etc. (tabelul 4.1).

Materiile fecale se prelevează după emisie spontană în vase sterile. Dintr-o cantitate de aproximativ un gram de materii fecale, se prepară

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 4.1

Produsele patologice necesare a fi recoltate în diferite manifestări clinice determinate de enterovirusuri

Produs patologic	Neuroinfecţii	Mialgie	Boli cardiace	Exanteme şi enanteme	Boli respiratorii	Boli oculare	Boli digestive	Infecţii ante-perii neonatale
Fecale	+	+	+	+	+	+	+	+
Exsudat faringian	+	+	+	+	+	+	+	+
Lichid cefalorahidian	+	+	−	+	−	−	−	+
Sînge	+	+	+	+	+	+	+	+
Lichid vezicular şi elemente cutanate	−	−	−	+	−	−	−	−
Vomismente	−	−	−	−	−	−	+	−
Lichid pericardic	−	−	+	−	−	−	−	−
Organe (în cazuri letale)	+	+	+	+	+	+	+	+

o suspensie de 10%, în general în mediul Hanks. Se adaugă antibiotice (penicilină 100 U/ml şi streptomicină 100 μg/ml). Suspensia de materii fecale se poate face în mojar, mixer, flacon cu gură largă conţinînd perle de sticlă sau tub ce va fi plasat pe un agitator mecanic timp de 1 oră. După omogenizare, suspensia este congelată o noapte sau mai puţin, pînă la inocularea sa. Congelarea are ca scop diminuarea efectelor toxice în momentul cultivării. În ziua inocularii pe celule sau animale de laborator, flaconul este decongelat, centrifugat (dacă este posibil la rece) timp de 20 de minute la 4 500 ture/minut şi apoi supernatantul este inoculat. În cazul în care nu este posibil să se obţină produsul spontan se poate recurge la recoltarea cu tampon rectal care este descărcat apoi în acelaşi mediu.

Masele vomitate prelucrate la fel cu materiile fecale pot servi pentru izolarea de enterovirusuri de la pacienţi cu infecţii enterovirale (Mintz şi colab., 1979).

Exsudatul faringian se recoltează pe tampon ca pentru examenele bacteriologice şi se descarcă apoi în 1—2 ml de mediu Hanks. Se adaugă antibiotice în aceeaşi concentraţie şi se pune la congelat. Apoi se prelucrează la fel ca şi materiile fecale.

Lichidul cefalorahidian, recoltat steril prin puncţie rahidiană, este inoculat ca atare pe gazde de laborator.

Lichidul pericardic, recoltat prin puncţie, va fi inoculat de asemenea fără a fi prelucrat.

Lichidul din vezicule, recoltat cu pipeta Pasteur, poate fi inoculat ca atare sau, dacă veziculele sînt sparte, după adăugare de antibiotice.

Fragmente de ţesuturi sau viscere, recoltate steril la necropsie, sînt broaiate într-un mixer sau într-un mojar cu puţin nisip steril. Se realizează o suspensie de 10% în mediu de creştere, se centrifughează uşor pentru a îndepărta fragmentele cele mari, la 2 000 t/m timp de 10—15 minute, dacă este posibil în centrifugă cu răcire. Supernatantul este inoculat. Dacă prelucrarea nu poate fi executată imediat, fragmentele de organe şi ţesuturi vor fi puse în tampon glicerinat pînă la aducerea în laborator.

Scanned with OKEN Scanner

Sîngele se recoltează în primele zile de boală prin puncţie venoasă de la plica cotului conform tehnicilor uzuale. Se introduce într-o eprubetă sau în flacon steril şi se lasă să se exprime serul. Acesta este decantat în altă eprubetă constituind proba I de ser. Cheagul va fi mojarat, diluat în 3—4 ml Hanks şi apoi prelucrat, tratat cu antibiotice şi inoculat la fel ca fecalele. După 14—21 de zile se va recolta a doua probă de sînge pentru obţinerea serului II (tardiv) care împreună cu serul I vor fi introduse în reacţiile necesare stabilirii diagnosticului serologic. În anumite situaţii în care recoltarea sîngelui venos nu este posibilă (în special la copii), sîngele poate fi recoltat pe discuri de hîrtie de filtru prin puncţia degetului, metodă care a dat rezultate satisfăcătoare, similare cu cele obţinute din sîngele venos şi care lărgesc posibilităţile de investigare seroepidemiologică (Zavate şi colab., 1974; Pacsa şi colab., 1975; Cotor şi colab., 1978).

După recoltare, produsele vor fi etichetate, de preferat pe bandă de leucoplast, notîndu-se identitatea persoanei sau un număr de ordine. Probele vor fi însoţite de o fişă în care se va nota: numele şi prenumele bolnavului, vîrsta, data debutului bolii, data recoltării produsului şi natura lui, cîteva date privind simptomele clinice şi, eventual, tratamentul aplicat, cîteva date epidemiologice şi diagnosticul prezumtiv.

Transportul corect al probelor are o importanţă deosebită în ceea ce priveşte eficienţa diagnosticului de laborator. Recipientele cu produsele patologice, ca atare sau în medii conservante, vor fi ermetic închise pentru a se evita disecarea lor şi, totodată, contaminarea mediului extern. Produsele, cu excepţia sîngelui, vor fi imediat congelate în congelator, în gheaţă cu sare sau în zăpadă carbonică şi acetonă şi vor fi transportate de urgenţă în termos sau lăzi izoterme.

4.2. METODE CONVENŢIONALE DE DIAGNOSTIC ETIOLOGIC

În vederea diagnosticului etiologic al unei îmbolnăviri suspecte enterovirale se utilizează în mod curent examene virusologice, care constau din inocularea produselor patologice pe gazde receptive de laborator, izolarea virusului şi identificarea sa şi, totodată, din examene serologice care vizează demonstrarea apariţiei sau creşterii de cel puţin 4 ori a anticorpilor specifici.

4.2.1. EXAMENE VIRUSOLOGICE

4.2.1.1. *Izolarea virusului.* În mod curent, pentru izolarea enterovirusurilor se inoculează concomitent două tipuri de gazde de laborator: culturi celulare şi şoarecele nou-născut. În cazul în care este suspectat un anumit tip antigenic de enterovirus — de exemplu în cadrul unei epidemii a cărei agent etiologic este cunoscut sau în faţa unor manifestări clinice sugestive — se va ţine seama, aşa cum am arătat în capitolul 2.4, de afinitatea acestora pentru diferite gazde de laborator: virusurile Coxsackie pentru şoarecele sugar, virusurile ECHO pentru diferite culturi celulare.

a) *Culturile celulare* recomandate a fi inoculate diferă în raport cu tipurile antigenice de enterovirusuri, motiv pentru care se recomandă a

Scanned with OKEN Scanner

fi inoculate mai multe feluri de culturi (Schmidt şi colab., 1978; Mintz şi Drew, 1980; Mustafina, 1981). Mai larg utilizate sînt celulele primare de rinichi de maimuţă verde africană, diploidele umane, liniile celulare de rinichi de maimuţă (BS—C—1, VERO) sau liniile de culturi tumorale (HeLa, KB, RD).

Tehnicile de preparare a culturilor celulare, de inoculare şi de urmărire a rezultatelor, precum şi tehnicile de identificare pot fi consultate în tratate de specialitate (Aderca şi Ianconescu, 1962; Gaudin, 1964; Voiculescu, 1976).

Tuburile de culturi celulare inoculate se vor urmări zilnic timp de 14—20 zile, pentru punerea în evidenţă a efectului citopatogen (ECP) pe filmul celular. ECP se caracterizează prin rotunjirea celulelor, creşterea refringenţei şi detaşarea acestora de pe sticlă (fig. 4.1). În cazul enterovirusurilor nepoliomielitice ECP se dezvoltă mai încet decît la poliovirus. În timp ce unele tipuri antigenice distrug monostratul complet în cîteva zile, altele determină ECP abia după o săptămînă, afectînd 80—50 şi chiar 10% din suprafaţa filmului celular (Herrmann şi colab., 1972).

În condiţiile noastre de lucru în laborator, inocularea se efectuează în mod curent pe culturi celulare primare de rinichi de maimuţă sau pe linia celulară de rinichi de maimuţă BS—C—1 (Zavate şi colab. 1971; Zavate şi colab., 1973; Zavate şi colab., 1976a). Ca mediu de creştere se utilizează IC65, iar ca mediu de întreţinere şi inoculare mediul 199 (Morgan Morton, Parker) preparate de Institutul de seruri şi vaccinuri „Dr. I. Cantacuzino" Bucureşti. Se evită adăugarea de ser animal sau uman în medii după inoculare, acesta avînd un efect inhibitor.

Metoda plajelor este mai rar utilizată pentru izolarea primară a enterovirusurilor. Este de preferat în cazul în care se suspectează o infecţie cu mai multe tipuri antigenice de enterovirusuri. În rest, metoda plajelor serveşte pentru testări cantitative, adică pentru stabilirea numărului de particule virale prezente la un moment dat într-un produs patologic sau într-o suspensie. O unitate formatoare de plajă (UFP) corespunde unui număr variabil de virioni care poate fi stabilit prin ultracentrifugare, colorare negativă şi numărarea la microscopul electronic. Plajele determinate de virusurile ECHO sînt în general mici (4—11 mm), cu contur neregulat, un centru cetos şi apar după 3—10 zile de la inoculare. Unele tipuri antigenice (ECHO tip 7, 8, 12) formează plaje cu contur regulat. Virusurile Coxsackie determină plaje mai mari similare cu cele ale poliovirusurilor (fig. 4.2).

b) *Şoarecele nou-născut* este singura gazdă de laborator pentru aproape toate tipurile antigenice de virus Coxsackie grup A, iar alături de culturile celulare poate servi şi pentru izolarea virusurilor Coxsackie grup B. Inocularea se va face pe 8—10 şoareci nou-născuţi în vîrstă de 24, maximum 48 de ore provenţii de la o singură mamă. Fiecare şoricel va fi inoculat concomitent pe cale intracerebrală, intraperitoneală şi subcutanată pentru a se mări şansele de izolare, diferitele tipuri antigenice de virusuri Coxsackie avînd preferinţă pentru una sau alta din aceste căi.

Animalele vor fi urmărite timp de 14—20 de zile. În caz de rezultat pozitiv apar fenomene de boală caracterizate prin paralizii de tip flasc sau spastice în raport cu virusul izolat, aşa cum vom arăta în continuare. Uneori animalele nu paralizează dar nu cresc în greutate, nu se hrănesc, prezintă alopecii şi cianoză. Unele tipuri antigenice determină doar hidrocefalii, convulsii şi zburlirea părului. În sfîrşit, pentru multe alte tulpini

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 4.1. — Efect citopatic determinat de virus ECHO tip 21 pe culturi celulare de amnios uman. Leziuni de debut cu mase de celule rotunde și uneori piriforme. Examen direct (după Gaudin, 1964)

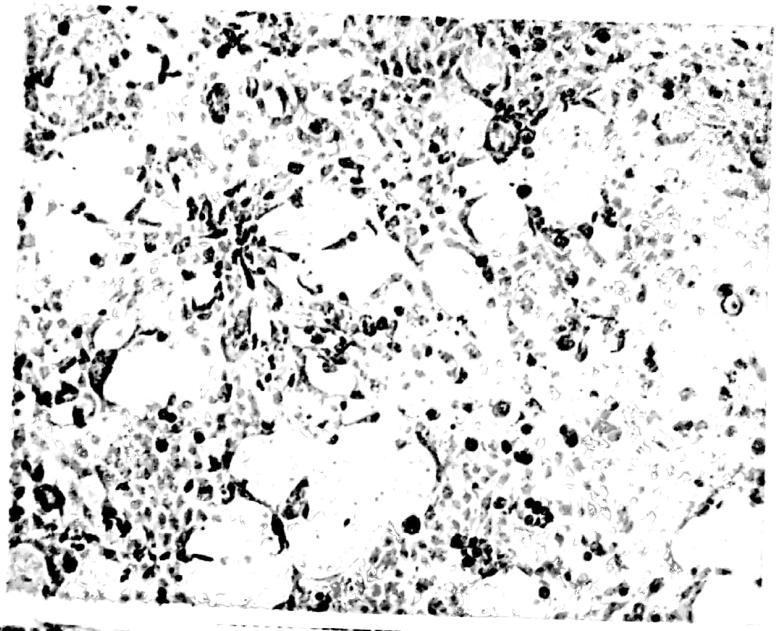


Fig. 4.2. — Aspectul plajelor determinate de virusul ECHO tip 11 (plaje mici) și comparativ de virusul polio (plaje mari) pe culturi de celule de rinichi de maimuță (după Gaudin, 1964)

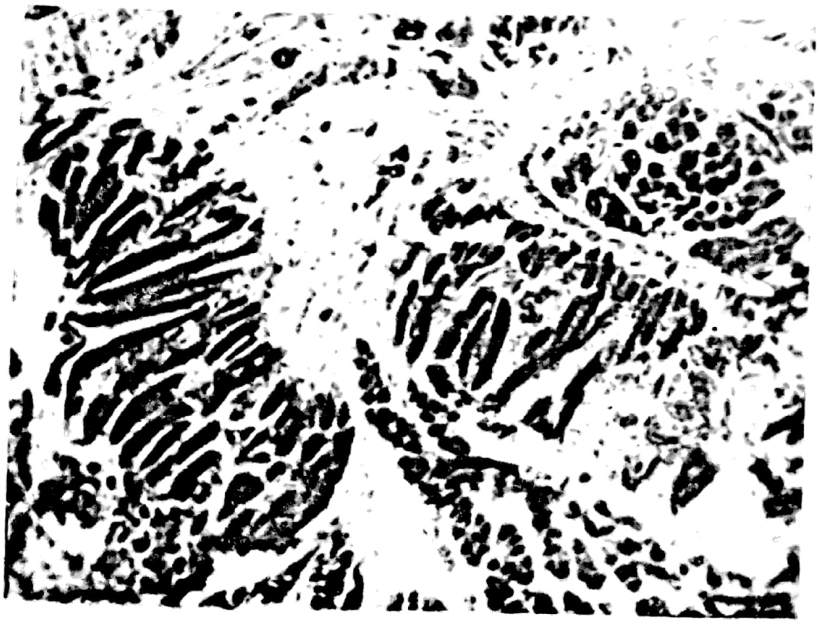


Fig. 4.3. — Leziunile musculare la șoarecele nou-născut inoculat cu virus Coxsackie A. Alterarea fibrelor musculare cu omogenizare, infiltrat inflamator limfohistiocitar (după Gaudin, 1964)

Scanned with OKEN Scanner

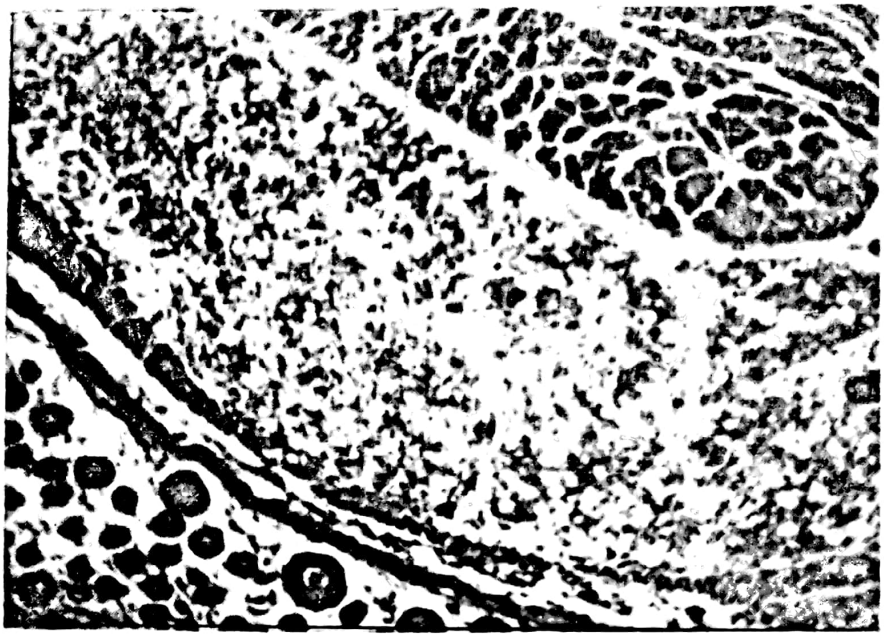


Fig. 4.4. — Leziuni în țesutul adipos la șoarecele nou-născut inoculat cu virus Coxsackie B. Infiltrat inflamator important limfohistiocitar (după Gaudin, 1964)

Fig. 4.5. — Imunofluorescența celulelor FL infectate cu virus ECHO. Imunofluorescența apare în citoplasmă și în nucleu după 20 de ore (după Kawanishi, 1978, cap. 2)

Scanned with OKEN Scanner

este necesară efectuarea de 3—4 pasaje oarbe pentru a se ajunge la izolarea virusului.

Pe baza aspectului paraliziilor și a leziunilor morfopatologice virusul izolat pe șoarecele nou-născut poate fi încadrat în una din cele două subgrupe de virus Coxsackie. Astfel:

— tulpinile de virus Coxsackie A determină paralizii de tip flasc ale membrelor care se generalizează și în final conduc la moartea animalelor. Examenul histopatologic evidențiază (fig. 4.3) leziuni musculare de tip degenerativ (dispariția striațiilor transversale, degenerescență hialină a fibrei musculare, necroze etc.) și infiltrative (edem, infiltrație interstițială cu mononucleare etc.);

— tulpinile de virus Coxsackie B determină tremor, spasm muscular generalizat, paralizii de tip spastic, ataxie, semne encefalitice. Examenul histopatologic (fig. 4.4) indică leziuni ale sistemului nervos central caracterizate prin distrugeri neuronale, leziuni ale acinilor din pancreas, leziuni degenerative hepatice și ale țesutului adipos interscapular, leziuni pulmonare și miocardice precum și leziuni de miozită în focare; enterovirusul 71 determină leziuni ale mușchilor striați similare cu cele provocate de virusurile Coxsackie B dar fără leziuni ale sistemului nervos central (Koroleva și Graceva, 1980).

Șoriceii bolnavi se sacrifică, se recoltează creierul, se secționează membrele și se eviscerează. Se obține astfel o carcasă musculară care constituie sursa de virus. Se conservă în glicerină la +4°C sau prin congelare. Din creierul și mușchii animalelor bolnave se prepară o suspensie 10% în tampon fosfat cu 0,78% albumină bovină sau în ser normal de iepure inactivat și diluat, care este centrifugată 10 min la 3 000 t/m, iar supernatantul este reinoculat în vederea titrării, identificării și a caracterizării tulpinei izolate.

4.2.1.2. *Identificarea virusului.* Identificarea tulpinilor suspecte de enterovirusuri se realizează prin mai multe procedee care constau din: reacția de neutralizare pe cultură celulară sau pe animal (cea mai fidelă și larg răspîndită), reacția de fixare a complementului, reacția de inhibare a hemaglutinării, reacția de aglutinare a latexului etc.

a) *Seroneutralizarea* rămîne metoda de elecție pentru identificarea enterovirusurilor fiind utilizată și în prezent în laboratoarele noastre (Zavate și colab., 1976 b; Zavate și colab., 1980). Ea constă din punerea în contact *in vitro* a tulpinii de virus (100 DCP_{50}/0,1 ml) și a serurilor specifice individuale sau în amestecuri și apoi inoculare pe gazde receptive: cultura celulară sau șoarecele nou-născut. Orice identificare, deci, trebuie să fie precedată de o titrare a virusului.

Deși metoda este considerată ca o metodă de referință, se va ține seama de unele dificultăți legate de existența la unele serotipuri (ECHO 6, ECHO 4, Coxsackie A9) a două faze dintre care una, notată cu S, slab neutralizabilă și de obținerea anevoioasă a unor seruri anti fără reacții heteroloage.

Prepararea serurilor de diagnostic a fost realizată pe diferite animale ca: șoareci (Van Ekdom și colab., 1979), șobolani (Adam, 1970), iepuri (Dodonova și colab., 1975), cobai (Engler și Keairnes, 1971), cai (Melnick și Hampil, 1970; Mihailova, 1981). Animalele sînt inoculate cu antigenele corespunzătoare cultivate pe culturi celulare sau șoarece nou-născut, bine centrifugate pentru a nu determina apariția de anticorpi anticelulari. Antigenele pot fi injectate ca atare sau purificate cu fluorocarbon, bento-

Scanned with OKEN Scanner

nită sau prin alte procedee. Ele trebuie să posede un titru ridicat şi să aibă o bună capacitate antigenică. După Dodonova şi colab. (1975), titrurile neutralizante optime sînt cele de 1 : 800 — 1 : 3 200 dar există dezavantajul apariţiei de anticorpi heterologi (Gaudin şi colab., 1971). Pe cai, Melnick şi Hampil (1970) au obţinut titruri în jur de 1 : 10 000. Au fost preparate seruri native sau seruri liofilizate (Dodonova şi colab., 1975 ; Van Ekdom şi colab., 1979 ; Melnick şi Hampil, 1970 ; Melnick şi colab., 1973).

În ţara noastră, în cadrul Institutului de seruri şi vaccinuri „Dr. I. Cantacuzino" a existat o preocupare permanentă pentru preparare de seruri neutralizate anti-Coxsackie şi anti-ECHO (Ionescu-Mihăeşti şi colab., 1959 ; Voiculescu, 1966), trusa de seruri de diagnostic cu care se lucrează în prezent în laboratoarele de profil fiind preparată de asemenea în cadrul acestui institut. Această trusă conţine serurile anti-Coxsackie A1—A19 şi B1—B6 şi anti-ECHO 1—9, 11—15, 19—20, 22, 24—25 şi 30. Efectele neutralizante încrucişate pot fi întîlnite între tipurile antigenice de ECHO 1 şi 8, 30 şi 8, 2 şi 6, 12 şi 11, 12 şi 18.

Pe *cultura celulară* se recomandă ca înainte de a se trece la identificarea tulpinii cu serurile specifice pentru enterovirusurile nepoliomielitice să se elimine poliovirusul. În continuare, se poate trece la neutralizarea cu seruri anti-Coxsackie sau ECHO individuale sau în amestecuri imaginate de diferiţi cercetători în scopul de a reduce volumul de lucru. Principiul constă din prepararea unor amestecuri de seruri în aşa fel încît fiecare ser să figureze în două amestecuri bine stabilite care să permită precizarea identităţii tipului antigenic. Este necesar a se ţine seama ca titrurile serurilor să fie apropiate, deoarece, un ser cu titru ridicat ar putea produce, după Gaudin (1964), neutralizări heteroloage. Pe de altă parte, există şi dificultăţi legate de un titru prea scăzut al anticorpilor.

Redăm în tabelul 4.2 un exemplu de amestecuri neutralizante utile pentru identificarea enterovirusurilor care determină ECP pe culturi celulare, propuneri de acest fel fiind numeroase (Melnick şi colab., 1973 a ; Gaudin, 1964).

Pentru serurile neutralizante anti-ECHO preparate în ţară se recomandă următoarele amestecuri:

Amestec I = E1 + E8 + E30 + E2 + E6
Amestec II = E3 + E4 + E5 + E7 + E9
Amestec III = E11 + E12 + E13 + E14 + E15
Amestec IV = E19 + E20 + E22 + E24 + E25

Într-o a doua etapă, serurile din amestecul neutralizant se lucrează individual pentru a se stabili exact tipul antigenic de virus ECHO.

Amestecul virus + ser (sau seruri) se inoculează pe culturi celulare în tub sau, mai rar, pe plăci pentru testul de inhibare a formării plajelor. Se urmăreşte ECP sau se poate aplica metoda colorimetrică care permite evidenţierea tuburilor de culturi celulare în care s-a produs neutralizarea prin observarea culorii mediului. Tuburile în care virusul este prezent şi a produs liza celulară rămîn roşii în timp ce în tuburile în care s-a produs neutralizarea, culturile celulare se dezvoltă normal şi datorită metabolismului lor virează mediul în galben.

Pe *şoarecele nou-născut* identificarea tipului antigenic de virus Coxsackie se bazează pe acelaşi principiu, fiind însă destul de laborioasă. Ea va fi precedată de titrarea tulpinii izolate. Odată stabilit titrul suspensiei se va efectua amestecul virus + ser care va fi apoi inoculat la animale în aceleaşi condiţii menţionate în capitolul privind izolarea virusului.

Scanned with OKEN Scanner

În vederea scurtării timpilor de lucru, se propun, ca şi pentru culturi celulare, efectuarea de amestecuri de seruri neutralizante. Pentru serurile neutralizante preparate în ţara noastră se recomandă următoarele amestecuri pentru virusul Coxsackie A şi B:

Amestec I = A2 + A3 + A4 + A5 + A6 + A8 + A9 + A10
Amestec II = A1 + A7
Amestec III = B1 + B2 + B3 + B4 + B5 + B6
Amestec IV = A11 + A12 + A14 + A18
Amestec V = A13 + A15 + A16 + A17 + A19.

Tabelul 4.2

Distribuţia de seruri imune faţă de enterovirusuri în amestecuri propuse de Lim Beneyesh Melnick (cit. de Schmidt şi colab., 1971) în vederea identificării enterovirusurilor în probe de neutralizare

Serul imun anti-		Serul imun prezent în amestec:								Proba de neutralizare pt. identificarea enterovirusurilor
		A	B	C	D	E	F	G	H	
ECHO	15	×								A
Coxsackie	A7	×	×							AB
„	B1	×		×						AC
ECHO	33	×			×					AD
Coxsackie	B4	×				×				AE
ECHO	7	×					×			AF
„	4	×						×		AG
„	1	×							×	AH
„	21		×							B
„	2		×	×						BC
Coxsackie	B2		×		×					BD
Polio	2		×			×				BE
ECHO	19		×				×			BF
Coxsackie	A9		×					×		BG
ECHO	3		×						×	BH
„	24			×						C
„	6			×	×					CD
Coxsackie	B5			×		×				CE
Polio	1			×			×			CF
Coxsackie	B3			×				×		CG
ECHO	12			×					×	CH
„	25				×					D
„	13				×	×				DE
„	14				×		×			DF
„	16				×			×		DG
Polio	3				×				×	DH
ECHO	11					×				E
„	18					×	×			EF
„	17					×		×		EG
„	22					×			×	EH
„	27						×			F
„	20						×	×		FG
Coxsackie	B6						×		×	FH
ECHO	31							×		G
„	23							×	×	GH
Coxsackie	A16								×	H
ECHO	29	×		×			×			ACF
„	5	×						×		AEG
„	26		×		×	×	×			BDF
„	9		×				×		×	BFH
„	30			×				×		CG
„	32				×	×			×	DEH

Scanned with OKEN Scanner

Avînd în vedere frecvenţa circulaţiei serotipurilor respective în teritoriul nostru, se recomandă a se lucra pentru început cu amestecurile I, II şi III şi, în caz de rezultate negative, cu amestecurile celelalte.

Pentru al doilea timp, serurile individuale din amestecul neutralizant vor fi reluate pentru a se stabili tipul antigenic de virus Coxsackie.

Animalele inoculate cu amestec virus + ser specific neutralizant nu vor mai face boala, în timp ce la martori vor apare paralizii specifice.

Aşa cum am menţionat, există unele situaţii în care neutralizarea nu dă rezultate satisfăcătoare. Cauza principală a acestor eşecuri se datorează formării, sub acţiunea serului, de agregate de particule virale, inconvenient care poate fi înlăturat prin tratarea suspensiei de virus cu dezoxicolat de sodiu, cloroform sau prin filtrare (Melnick şi Hampil, 1970; Kapsenberg şi colab. 1979). Dificultăţile legate de reacţii heterotipice au putut fi şi ele depăşite, titrul anticorpilor specifici fiind de regulă mult mai crescut decît cel al anticorpilor heterologi, ceea ce permite interpretarea corectă a rezultatelor (Melnick şi Hampil, 1970).

b) *Reacţia de fixare a complementului.* Această reacţie nu a fost larg întrebuinţată pentru identificarea enterovirusurilor din cauza numeroaselor reacţii heteroloage şi a dificultăţilor în prepararea serurilor pe animal (Gaudin, 1971; Schmidt, 1971; Schmidt şi Klein, 1973; Mihailovskaia, 1973).

Antigenul pentru reacţie este preparat pe şoareci, inoculaţi cu diferite tulpini de enterovirus şi apoi purificat cu sulfat de protamină, fluorocarbon sau bentonită. Serurile de referinţă sînt cele utilizabile şi în reacţia de neutralizare.

În ceea ce priveşte dificultăţile constatate menţionăm că: reacţiile nespecifice se pot datora interferenţei cu alţi anticorpi virali, anticelulari, antişoarece etc.; puterea anticomplementară a antigenelor poate fi înlăturată prin adăugare de ser proaspăt de cobai; puterea anticomplementară a serurilor de referinţă se poate corija prin adăugare de ser uman proaspăt şi prin inactivare. Reacţiile încrucişate au fost constatate între virusurile Coxsackie A5 şi A16, A3 şi A8, A11 şi A15, ECHO 1/8 şi ECHO 13. În plus, se cere o acurateţe deosebită în lucru, realizarea echilibrului diferitelor elemente introduse în reacţie fiind esenţială.

c) *Reacţia de inhibare a hemaglutinării* (RIH) poate fi aplicată pentru acele tipuri antigenice de virusuri ECHO şi Coxsackie care dau hemaglutinare şi care au fost enumerate în capitolul 2.

Tulpinile hemaglutinante se pot identifica prin RIH cu seruri imune de referinţă specifice de tip tratate pentru îndepărtarea inhibitorilor nespecifici cu caolin şi absorbite pe hematii sau cu rivanol (Savcenko şi Gubenko, 1975). Diluţia de antigen pentru identificare trebuie să conţină 10 unităţi hemaglutinante. Reacţia este rapidă, sigură şi specifică, citîndu-se rar reacţii heteroloage.

Se utilizează globule roşii umane, iar ca diluant ser fiziologic sau tampon veronal. RIH a fost aplicată pentru identificarea enterovirusurilor încă din anul 1964—1965 în ţara noastră (Ciugarin şi colab. 1964 a, b; Ciugarin şi colab., 1965), fiind utilizată şi mai recent pentru enterovirusul 70 şi alte enterovirusuri (Kono şi colab., 1978; Suzuki şi colab., 1979).

d) *Reacţia de aglutinare a latexului* sensibilizat cu anticorpi specifici a fost propusă, de asemenea, pentru identificarea enterovirusurilor (Schmidt şi Klein, 1974; Schmidt şi Klein, 1975; Siegel şi colab., 1979).

Scanned with OKEN Scanner

După o prelucrare specială a particulelor de latex în prezența serului hiperimun imunoglobulinele G se fixează pe suprafața particulelor de latex care pot fi păstrate cîțiva ani la 4°C. Tehnica dă rezultate similare cu reacția de inhibare a hemaglutinării.

4.2.2. DIAGNOSTIC SEROLOGIC

Este cunoscut că, pentru confirmarea unui diagnostic etiologic în enteroviroze, nu este suficientă izolarea agentului viral, ci este necesar a se pune în evidență apariția sau creșterea de cel puțin patru ori a titrului anticorpilor față de virusul izolat.

Numărul mare de tipuri antigenice de enterovirusuri face imposibil un diagnostic serologic în absența izolării virusului (Schmidt și Lennette, 1973; Sohier și Gaudin, 1978; Schilt, 1979), cu excepția cazurilor apărute în epidemii în care agentul viral fiind cunoscut pot fi testați cu succes anticorpii numai față de acest singur antigen (Adamczyk și Adamczyk, 1971; Vâță și colab., 1980). Examene serologice singure mai pot fi efectuate pentru aprecierea stării de imunitate a masei populației față de anumite tipuri antigenice de enterovirusuri și, indirect, a gradului de răspîndire a acestora. Așa cum am arătat, pentru examene serologice proba I de sînge se va recolta în primele zile de boală iar proba II peste 15—21 zile, ambele urmînd a fi puse în lucru în aceeași ședință.

Metodele mai frecvent utilizate pentru diagnosticul serologic sînt aceleași cu cele pentru identificarea virusului: reacția de neutralizare, reacția de fixare a complementului și reacția de inhibare a hemaglutinării.

a) *Reacția de neutralizare.* Este metoda cea mai larg utilizată pentru diagnosticul serologic în infecțiile enterovirale. Ea constă din punerea în contact a diluțiilor succesive din serurile de cercetat (I și II) față de o cantitate fixă de virus obținută prin titrare (200 DCP 50 sau DL_{50}). Amestecul se menține timp de 2 ore la 37°C după care se inoculează pe gazde de laborator — culturi celulare sau animale — urmărindu-se în continuare rezultatele prin aceleași procedee ca și la identificare.

Reacția de neutralizare se poate pune în evidență pe tuburi de culturi celulare (tehnica uzuală sau micrometoda), prin testul colorimetric sau prin testul de reducere a plajelor. Testul colorimetric, amintit în capitolul privind identificarea, are avantajul rapidității fiind recomandabil în anchete seroepidemiologice vaste în care celelalte tehnici devin prea laborioase. Este considerat foarte specific dar greu aplicabil la virusurile cu creștere lentă. Reacția de reducere a plajelor este mult mai laborioasă și necesită o tehnicitate mai ridicată din partea investigatorului. Se utilizează uneori în infecțiile cu virus ECHO. Recent, Nagy și Takatsy (1980) au propus un test radial de neutralizare a plajelor care a dat rezultate concordante cu reacția de neutralizare standard. Pe animale, activitatea neutralizantă a serului de cercetat este exprimată de diluția care protejează 50% din animalele inoculate.

O serie de studii privind specificitatea și aplicabilitatea reacției de neutralizare (Gaudin, 1964; Adamczyk și Adamczyk, 1971) au scos în evidență unele particularități în interpretarea rezultatelor. Astfel, pentru ca rezultatele să fie fidele este necesar a se lucra pe culturile celulare cele mai sensibile pentru a se evita erorile datorate excesului de anticorp. Feno-

Scanned with OKEN Scanner

menul de *breakthrough* poate determina, la rîndul său, dificultăţi în interpretarea rezultatelor observîndu-se o neutralizare timp de 4—5 zile şi apoi apariţia bruscă a ECP.

Anticorpii neutralizaţi apar în primele zile de boală, se menţin la un titru ridicat 3—6 ani şi pot fi detectaţi practic toată viaţa.

b) *Reacţia de fixare a complementului.* Această metodă este mai rar utilizată pentru diagnostic serologic din cauza reacţiilor heteroloage observate de numeroşi cercetători. Anticorpii fixatori de complement au specificitate de tip. Ei apar precoce, la 3—8 zile de la debut, ating titrul maxim la 3 săptămîni şi se menţin un timp relativ scurt în comparaţie cu cei neutralizanţi (maximum 1—3 ani). S-a constatat o corelaţie mediocră între aceste două teste.

c) *Reacţia de inhibare a hemaglutinării* (RIH). Pentru punerea în evidenţă a anticorpilor faţă de enterovirusurile care au proprietăţi hemaglutinante a fost utilizată aceeaşi tehnică ca şi pentru identificare. Elementele reacţiei sînt reprezentate de mediul culturilor celulare pe care s-a multiplicat virusul, hematiile umane grup O şi serurile de cercetat. Anticorpii hemaglutinanţi apar în primele zile de boală, cresc şi apoi descresc repede, menţinîndu-se în sînge aproximativ 3 ani.

În ţara noastră (Ciugarin şi colab., 1965; Ciugarin şi colab., 1966) şi în străinătate (Chandnani şi colab. 1973; Sergheev, 1980; Zakirova şi colab., 1980) această reacţie a fost utilizată pentru diagnosticul serologic în infecţiile cu tipuri antigenice hemaglutinante de virus ECHO şi Coxsackie. În plus, au mai fost efectuate studii comparative a acestei reacţii faţă de reacţia de aglutinare a latexului, de fixare de complement sau de neutralizare (Brade şi colab., 1975). S-a constatat că rezultatele obţinute în RIH nu au fost totdeauna concordante cu celelalte iar absorbţia inhibitorilor nespecifici pe caolin sau bentonită duce la distrugerea unei părţi importante de anticorpi.

În concluzie, referindu-ne la metodele convenţionale de diagnostic etiologic în enteroviroze este necesar a accentua asupra cîtorva particularităţi, dintre care unele relevate şi de alţi specialişti (Sohier şi Gaudin, 1978; Schilt, 1979; Brassart şi colab., 1980):

— Izolarea unui enterovirus din fecale sau exsudat nu permite stabilirea cu siguranţă a diagnosticului etiologic, avînd în vedere larga răspîndire a enterovirusurilor în masa populaţiei aparent sănătoase; pentru acest motiv virusul trebuie să fie izolat mult mai frecvent printre persoanele bolnave, în comparaţie cu cele sănătoase (de aceeaşi vîrstă, sex, din acelaşi teritoriu şi din aceeaşi perioadă de timp); totodată trebuie să fie eliminaţi alţi agenţi etiologici (virali, bacterieni, parazitari, toxici etc.) care ar putea determina sindromul respectiv; mai semnificativă apare izolarea enterovirusului din lichid cefalorahidian, cheag, lichid de vezicule sau din ţesuturi şi organe-ţintă.

— Examenul serologic nu este posibil, în general, decît la pacienţii de la care a fost izolat virusul. El trebuie să evidenţieze apariţia sau creşterea de patru ori a titrului anticorpilor. Totuşi, un rezultat negativ nu poate exclude cu siguranţă o îmbolnăvire enterovirală deoarece pot fi înregistrate reacţii fals-negative, care se pot datora proprietăţilor tulpinii de virus (slab antigenică) sau apariţiei tardive a anticorpilor serici în aşa fel încît serul II nu demonstrează o creştere semnificativă a acestora, fiind necesar un al III-lea ser. Rezultatele fals-pozitive se pot datora reacţiilor heteroloage, fiind dovedit (în special în RFC) că, odată cu apariţia anti-

Scanned with OKEN Scanner

corpilor specifici față de virusul infectant, pot să apară anticorpi anamnestici față de alte virusuri, în unele situații cu o conversie serologică semnificativă. Anticorpii anamnestici se caracterizează printr-o apariție precoce.

— Momentul apariției, persistența și semnificația anticorpilor este diferită pentru anticorpii neutralizanți, fixatori de complement, hemaglutinanți sau precipitanți.

— Chiar în condițiile cele mai bune, rezultatele examenelor virusologice și serologice se obțin într-un timp relativ îndelungat, de săptămîni sau chiar luni, cel mai adesea după externarea pacientului din spital.

— Metodele convenționale rămîn de largă utilitate pentru cercetarea circulației enterovirusurilor nepoliomielitice și a stării de imunitate în masa populației, precum și pentru aprecierea eficienței vaccinării în cazul poliovirusurilor.

4.3. METODE RAPIDE DE DIAGNOSTIC ETIOLOGIC

Principalul inconvenient al metodelor clasice de diagnostic etiologic în enteroviroze este, așa cum am arătat, durata relativ mare în care se obțin rezultatele, ceea ce face ca pentru clinician acestea să fie inoperante. Or, un diagnostic etiologic rapid este necesar pentru stabilirea stadiului bolii, a reactivității imunologice, evitarea administrării inutile de antibiotice, eventual instituirea chimioterapiei antivirale și orientarea măsurilor de profilaxie.

Din aceste motive în ultimii ani au fost făcute eforturi considerabile pentru realizarea unui diagnostic virusologic rapid care implică însă condiții de dotare și tehnicizare mai pretențioase. Elaborarea, promovarea și evaluarea unor metode accesibile au constituit obiectivele principale ale grupurilor de experți pentru diagnostic rapid de laborator în virusologie, înființate în anul 1975 în Europa și în 1977 în America de Nord (Denoyel și Peyramond, 1980). Primul simpozion asupra diagnosticului rapid al virozelor s-a ținut la Amsterdam în 5 septembrie 1977, în cadrul celui de al XVI-lea simpozion al Asociației europene contra bolilor virale, și a avut trei secții : imunofluorescență, microscopie electronică și alte metode de diagnostic serologic rapid prin depistarea IgM specifice (Gardner, 1977 ; Gardner, 1978).

Preocupări pentru introducerea metodelor rapide de diagnostic necesită a fi menționate și pentru țara noastră în Institutul de virusologie București, încă din anul 1955 (Cajal și Mateescu, 1955 ; Cajal și Cernescu, 1976 ; Cajal și colab., 1980 ; Cajal, 1980 ; Dumitrescu, 1979 ; Duca, 1979).

Diagnosticul etiologic rapid în bolile virale se poate realiza prin două categorii de metode : microscopie electronică cu imunoelectronomicroscopie și metode cu anticorpi marcați. Ambele grupe de metode pot fi utilizate pe de o parte pentru evidențierea antigenului, adică a virusului în produse patologice, țesuturi sau în culturi celulare inoculate, și, pe de altă parte, pentru evidențierea anticorpilor specifici sau a globulinelor IgA și IgM.

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1. MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Microscopia electronică (ME), cunoscută în virusologie încă din anul 1948, a putut fi aplicată în practică abia după 1959, cînd s-a introdus colorația negativă. În ultimii 5 ani ME a devenit o metodă indispensabilă în diagnosticul virusologic (Ploaie și Petre, 1979; Kjeldsberg, 1980).

Pentru un diagnostic rapid se utilizează *imunoelectronoscopia* care constă din agregarea virionilor din produsul examinat cu ser imun specific și examinarea complexelor imune formate după fixare și colorare negativă. Este o metodă rapidă, are specificitate și permite, totodată, examenul morfologic al virusului. Este utilizată pentru punerea în evidență a enterovirusurilor în produse patologice, în special în fecale, și pentru identificarea lor pe culturi celulare.

Punerea în evidență a enterovirusurilor direct în materii fecale a fost realizată de mai multe colective de cercetători. Examenul electronomicroscopic al sedimentului materiilor fecale obținut după ultracentrifugare (2 ore la 50 000 g/min) și tratare cu sulfat de amoniu (60 %) a crescut de 10—40 ori șansele de depistare a enterovirusurilor (Buffet-Janvresse și colab., 1975; Caul și colab., 1978).

Pentru identificarea enterovirusurilor, Anderson și Doane (1973) au descris un procedeu rapid care constă din încorporarea serurilor în agar, punerea în contact cu virusul de identificat și colorarea negativă cu acid fosforowolframic. Rezultatele se apreciau după prezența sau absența agregatelor de complexe imune. Narang și Cood (1980) au adus ameliorări tehnicii printr-o centrifugare mai redusă.

Metodele cu anticorpi marcați, cu izocianat de fluoresceină (Morgante și colab., 1978; Von Gemert și colab., 1979), peroxidază (Herrmann și colab., 1974; Yolken și Torsch, 1980), feritină (Berthiaume și colab., 1981), substanțe radioactive (Herrmann și Cliver, 1973) etc. au mai multe vaiante, directe sau indirecte, aplicate pentru evidențierea de antigene virale sau, mai rar, a anticorpilor specifici. Antigenele virale pot fi puse în evidență în produse patologice, în culturi celulare inoculate cu acestea, precum și în țesuturile-țintă obținute la biopsie sau necropsie.

4.3.2. IMUNOFLUORESCENȚA

Aplicată la început în studiul virusurilor poliomielitice, imunofluorescența a fost extinsă și în studierea altor enterovirusuri. Majoritatea tehnicilor directe propuse constau din marcarea cu izocianat de fluoresceină a anticorpilor antienterovirali specifici în vederea depistării antigenului. Morgante și colab. (1978) au propus o metodă perfecționată de conjugare a imunoglobulinelor față de virusurile Coxsackie B tip 1—6 cu izocianat de fluoresceină prin dializă inversă. Numeroși cercetători au aplicat această metodă la punerea în evidență a antigenelor enterovirale în ler de la cazurile de meningită virală (Taber și colab., 1973; MacIntosh și colab., 1978; Von Gemert și colab. 1979; Spînu și colab., 1981). În reacție se pun serurile față de tipurile antigenice cele mai frecvente în teritoriu.

În general, în mîna unor specialiști avizați, metoda a dat rezultate similare cu reacția de neutralizare (Frenck și colab. 1972) dar există dificultăți în diferențierea unei fluorescențe specifice de cea nespecifică, rezultatele fiind influențate de experiența cercetătorului și exigența tehnicilor

de lucru. După Von Gemert şi colab. (1979) testul trebuie confirmat prin reacţii serologice şi prin alte probe de laborator. A mai fost menţionat numărul mare de reacţii încrucişate ceea ce a dus, chiar, la propunerea utilizării metodei pentru identificarea de grup şi nu de tip (Chaudhary şi Westwood, 1970; Herrmann şi Cliver, 1973). Serurile specifice preparate pe mai multe specii animale nu au avut valori egale, Frenck şi colab. (1972) obţinînd pentru virusuri din grupul Coxsackie B cele mai bune rezultate pe hamster în comparaţie cu maimuţa, calul şi iepurele. Van Ekdom şi colab. (1979) au arătat că serul de iepure poate conţine anticorpi faţă de culturile celulare sau faţă de seroproteinele animale, determinînd fluorescenţă nespecifică sau precipitare fals-pozitivă. În figura 4.5 este redată imaginea imunofluorescenţei determinate de un virus ECHO în culturi celulare FL.

Pentru punerea în evidenţă a anticorpilor enterovirali, tehnica de imunofluorescenţă este mai rar folosită.

4.3.3. TEHNICI ELISA

Tehnicile ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent assay*), obiectul unor valoroase puneri la punct (Voller şi colab., 1976; Voller şi colab., 1978), constau din imobilizare de anticorpi pe o suprafaţă solidă (mărgele de plastic, suprafaţa eprubetei) — imunoadsorbant care reţine antigenul din proba de testat. Complexul este pus în evidenţă cu anticorpi marcaţi cu o enzimă, cel mai frecvent peroxidaza. Greutatea moleculară scăzută de 40 000 a peroxidazei permite pătrunderea intracelulară a anticorpilor marcaţi şi devine de 200 000 (Aspetov şi Riazanova, 1977; Duca, 1979; Ploaie şi Petre, 1979). Reacţia histochimică dintre enzima şi substratul ei dă un produs insolubil, vizibil la microscopul optic sau, după colorare negativă cu tetraoxid de osmiu, la microscopul electronic. Imunoperoxidaza se fixează pe antigenul viral specific, prezent în ţesut sau în celulă. Complexul antigen-anticorp-peroxidază, format intracelular sau extracelular se poate decela cu diferiţi reagenţi ca: benzidină, perhidrol, amestec de alfanaftol şi p-fenilendiamină (reactiv Nadi), leucocoloranţi etc. Sub acţiunea acestora, enzima capătă o culoare brun-închisă.

Testul ELISA este mai sensibil decît radioimunotestarea şi cel puţin tot atît de sensibil ca imunofluorescenţa fără a avea dezavantajul reacţiilor nespecifice ale acesteia din urmă. El a fost utilizat cu succes în detectarea enterovirusurilor în produse patologice în ţesuturi şi în culturi celulare inoculate (Herrmann şi colab., 1974; Aspetov şi Riazanova, 1977; Yolken şi Torsch, 1980 a, b).

De-a lungul anilor, metodei imunoenzimatice i-au fost aduse perfecţionări din punctul de vedere al materialelor plastice care sînt utilizate pentru adsorbţia anticorpilor realizîndu-se creşterea sensibilităţii reacţiei (Hendry şi Herrmann, 1979). Pentru virusuri Coxsackie, Voller şi colab. (1976) au propus utilizarea plăcilor de microaglutinare de polisteren. Katze şi Growell (1979) au propus, la rîndul lor, o variantă a metodei ELISA pentru detectarea virusurilor Coxsackie (chiar în diluţia de 1/20 000 şi pentru titrarea anticorpilor, sensibilitatea acesteia fiind egală cu reacţia de neutralizare.

Testul a fost, de asemenea, aplicat pentru evidenţierea anticorpilor (Katze şi Growell, 1980) sau a claselor de imunoglobuline specifice. Astfel, Dörries şi Ter-Meulen (1981), El-Hagrassy şi colab. (1980) şi El-Hagrassy

Scanned with OKEN Scanner

şi Banatvala (1981) au utilizat testul ELISA pentru detectarea în ser a IgG şi IgM faţă de virusurile Coxsackie B. S-a constatat o concordanţă cu reacţia de neutralizare, considerată cea mai specifică, dar reacţiile încrucişate au fost mai frecvente în ELISA (Yolken şi Torsch, 1980a; Yolken şi Torsch, 1981).

4.3.4. RADIOIMUNOTESTAREA

Bazată pe acelaşi principiu ca şi ELISA, în radioimunotestare (RIA) serul indicator este marcat radioactiv iar citirea reacţiei se face prin numărătoarea impulsurilor. Reacţia are dezavantajul necesităţii de a se introduce teste de confirmare datorită reacţiilor fals-pozitive.

RIA a fost utilizată pentru evidenţierea enterovirusurilor în culturi celulare, pentru identificarea virusurilor Coxsackie (Herrmann şi Cliver, 1973) şi pentru detectarea anticorpilor IgM şi IgG (Dörries şi Ter-Meulen, 1979).

4.3.5. REACŢII DE PRECIPITARE ÎN GEL

Aceste reacţii se bazează pe capacitatea complexelor antigen-anticorp de a forma precipitate vizibile sub formă de linii în gel de agar, ca urmare a migrării din puncte diferite. Se preconizează două metode de lucru: imunoelectroforeza şi dubla difuzie în gel de agar, în ambele rezultatele obţinîndu-se mult mai rapid decît prin metodele convenţionale.

Metoda de imunoelectroforeză a fost utilizată pentru punerea în evidenţă a enterovirusurilor în produse patologice ca lcr (Brown şi colab., 1978) şi fecale (Gaspar şi Edlinger, 1978), în lichidul de cultură celulară inoculată (Mac William şi Cook, 1975; Tsotsos, 1974) şi chiar pentru identificarea proteinelor precursoare ale enterovirusurilor (Vrijsen şi colab., 1980). Identificarea prin această metodă exclude folosirea culturilor celulare sau a animalelor, este economică din punctul de vedere al cantităţii de antigen şi ser, este rapidă şi specifică.

În ultimii ani contraimunoelectroforeza a fost introdusă şi pentru punerea în evidenţă a anticorpilor specifici în lichidul cefalorahidian de la bolnavi de meningită (Brown şi colab., 1978).

Metoda de dublă difuzie în gel de agar a fost utilizată de către Schmidt şi Lennette (1962), Cupcova (1975) şi Tsotsos (1974) pentru diagnosticul serologic în enterovirozele ECHO şi Coxsackie. Anticorpii precipitanţi apar mai precoce în comparaţie cu cei neutralizanţi sau fixatori de complement, motiv pentru care serul I trebuie recoltat cel mai tîrziu în primele 2—3 zile de boală. Rezultatele depind în mare măsură de calitatea antigenelor purificate şi concentrate şi de cea a anticorpilor din punctul de vedere al conţinutului în lipide şi hemoglobină. De fapt reacţia este rar utilizată în diagnosticul serologic al enterovirozelor.

4.4. MĂSURI DE PREVENIRE A INFECŢIILOR DE LABORATOR

Evitarea infecţiilor de laborator de orice fel constituie în prezent o preocupare susţinută atît pe plan naţional cît şi internaţional. Fără a prezenta un risc de talia celui din hepatita virală, turbare, rickettsioze ş.a., entero-

virusurile pot şi ele să determine infecţii de laborator cu atît mai mult cu cît în ultimul timp tehnicile noi implică participarea unui număr mare de personal. Posibilităţile de contaminare sînt multiple, căile digestivă prin mîini murdare sau respiratorie prin aerosoli fiind preponderente. În general, infecţia se produce datorită nerespectării regulilor de protecţie a muncii în laboratoare.

Culturile celulare pot constitui, la rîndul lor, un pericol pentru personalul din laboratoare (Barkley, 1979). Astfel, este cunoscută epidemia de la Marburg ca urmare a lucrului cu culturi celulare primare de maimuţă. Liniile celulare pot fi contaminate cu virusuri persistente, iar anumite linii celulare limfoide cu virus Epstein-Barr.

Pentru prevenirea infecţiilor de laborator se vor respecta cu riguozitate următoarele reguli de conduită:

— toate manoperele care pot cauza o infecţie accidentală vor fi executate în boxe speciale, prevăzute cu lămpi bactericide;

— materialul contaminat (sticlărie, medii etc.) va fi depus în containere închise, sterilizabile prin autoclavare;

— se vor evita, pe cît posibil, operaţiile de pipetare cu gura, folosindu-se pere de cauciuc sau seringi Cornwall; în cazul în care s-a lucrat cu pipete acestea vor fi introduse după întrebuinţare în amestec sulfocromic sau hipoclorit de sodiu şi apoi sterilizate;

— operaţiile de centrifugare şi cele de omogenizare se vor efectua în recipiente închise spre a se evita contaminarea prin aerosoli;

— în cursul manoperelor de inoculare pe animale se va acorda o atenţie deosebită umplerii seringii, eliminării aerului prin protejarea acului cu un tampon de vată îmbibat în alcool 70° şi se vor respecta măsurile de lucru aseptic şi antiseptic;

— se va interzice mîncatul şi fumatul în încăperile de lucru şi se va purta corect echipamentul de protecţie;

— toate materialele infectate se vor steriliza şi dezinfecta corect conform metodologiei recomandate în prezent (Gottardi, 1978; Barkley, 1979; Ivan, 1981);

— se va face instruirea periodică a personalului de toate categoriile din laboratoare şi urmărirea stării de sănătate a acestuia.

BIBLIOGRAFIE

ADAM D. (1970), *Quick antiserum preparation for the virus C. F. test. Immunization of rats with enteroviruses (ECHO and Coxsackie) and syncytial viruses*, Zeitbl. Bakt. T. Orig., **213**, *4*, 470—474.

ADAMCZYK B., ADAMCZYK G. (1971), *Specificity and practical applicability of directed neutralization test in diagnosing enteroviral diseases*, Z. ges. Hyg., **17**, *3*, 182—186.

ADERCA I., IANCONESCU M. (1962), *Culturi de celule în inframicrobiologie*, Edit. Academiei, Bucureşti.

ALEXANDRESCU M. (1973), *Practica virusologiei medicale*, Litografia IMF Iaşi, pp. 266—273.

ANDERSON N., DOANE F. M. (1973), *Specific Identification of Enteroviruses by Immunoelectron-microscopy Using a Serum-in-Agar Diffusion Method*, Canad. J. Microbiol., **19**, *15*, 585—589.

ASPETOV R. D., RIAZANOVA G. L. (1977), *Ispolzovanie immunoperoksidaznogo metoda dlea identifikaţii enterovirusov.*, Lab. Delo, *8*, 486—488.

BARKLEY E. (1979), *Safety considerations in the cell culture laboratory*, Meth. Enzymol., **58**, 36—43.

BAUMGARTEN A. (1980), *Viral immunodiagnosis*, Yale J. biol. Med., **53**, *1*, 71—83.

Scanned with OKEN Scanner

BERTHIAUME L., MICUŞAN V., ALAIN R., TREPANIER P. (1981), *Rapid identification of viruses by a simple indirect immune-electron-microscopy technique using ferritin-labelled antibodies*, J. Virol. Meth., **2**, *6*, 367—373.

BRADE H., KLEIN M., SCHMIDT W.A.K. (1975), *Die Bildung und Persistenz Latexagglutinations hemmender IgG — und IgM — Antikörper im Kaninchen nach Application vom Poliomyelitis-Coxsackie und Enzephalomyokarditsviren*, Zbl. Bakteriol., Parasit. Infectionskrankh. Hyg., Abl. 1, Orig. **A223**, *2*, 139—146.

BRASSART G., CARQUIN J., COUCHOT J., FANDRE M. (1980), *Isolement des virus dans le liquide céphalo-rachidian (LRC) particulièrement au cours des méningites à echovirus type 30*, Méd. Mal. infect., **10**, *10*, 492—497.

BRICOUT F. (1971), *Les infections à Coxsackie-virus et les infections à entérovirus*. In : *Maladies infectieuses* de R. Bastin, Ed. Méd. Flammarion, Paris, pp. 1389—1404.

BRINGUIER J. P., GAUDIN O. G., BRIGAUD M., TERRAILLON J., SOHIER R. (1971), *Réponse immunitaire de trois espèces animales (cobayes, hamsters, souris) à différents Coxsackie-virus A. 11. Etude des anticorps décelés par immunodiffusion en gel : comparaison avec les anticorps fixant le complément*, Ann. Inst. Pasteur, **121**, *4*, 551—561.

BROWN R. L., ZINNER S. H., MEGLIO F. D., GARRITY F. L., (1978), *Countercurrent Immunoelectrophoresis in the Diagnosis of Viral Infections of the Central Nervous System*, J. Infect. Dis., **138**, *6*, 911—915.

BUFFET-JANVRESSE Cl., BARBOTIN J. N., MASARD H. (1975), *Intérêt de la microscopie électronique pour la mise en évidence de structures virales dans les selles*, Nouv. Presse méd., **21**, *4*, 1599—1601.

CAJAL N., MATEESCU S. (1955), *Rapid diagnosis of rabies with the contrast-phase microscope* St. cerc. Inframicrobiol. Microbiol. Parazitol., *6*, 1—2, 35—39.

CAJAL N.(1958) — „Diagnosticul de laborator al bolilor virale", Ed. Acad. R. P. Română.

CAJAL N. (1960), *Some considerations on the diagnosis of human inframicrobial diseases*, Microbiol., Parazitol. Epidemiol., *5*, 385.

CAJAL N., CERNESCU C. (1974), *Diagnosticul rapid al virozelor*. In vol. : Abstr. Works of the „Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, 1973—1974, pp. 75.

CAJAL N., CERNESCU C. (1976), *Importanţa laboratorului de virusologie în diagnosticul rapid al virozelor*, Bacteriol., Virusol., Parazitol., Epidemiol., 1976, *21*, 129.

CAJAL N., COPELOVICI Y., STRATI I. (1980), *Posibilităţi actuale de diagnostic virusologic. Nota 1. Progrese în diagnosticul virusologic*. În vol. : Abstr. Works of the „Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, Bucureşti, pp. 17—18.

CAJAL N. (1980), *Cîteva realizări ale virusologiei româneşti sub egida Academiei de ştiinţe medicale*. In vol. : Abstr. Works of the „Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, Bucureşti, pp. 14—15.

CAUL E. O., ASHLEY C. R., EGGLESTONE S. I. (1978), *An improved method for the routine identification of faecal viruses using ammonium sulphate precipitation*, FEMS, Microbiol. Lett., **4**, *1*, 1—4.

CHANDNANI R. E., PAL S. R., CHITKARA N. L. (1973), *Echovirus haemagglutination inhibition test for epidemiological survery in India : its utility and validity*,, Indian J. Med. Res., **61**, *8*, 1117—1123.

CHAUDHARY R. K., WESTWOOD I.C.N., (1970), *Detection cross-reactions by immunofluorescence within the picornavirus group*, Canad. J. Microbiol., **16**, *7*, 601—604.

CIUGARIN M., MANIŢIU M., ALEXANDRU M. (1964 a), *Contribuţii la studiul reacţiei de hemaglutinare în identificarea virusului ECHO*, St. Cerc. Inframicrobiol., **15**, *5*, 455—460.

CIUGARIN M., MANIŢIU M., ALEXANDRU M. (1964b), *Aspecte privind izolarea virusurilor enterice din lichidul cefalorahidian în anii 1961—1963*, St. Cerc. Inframicrobiol., **15**, *6*, 543—555.

CIUGARIN M., MANIŢIU M., IONESCU B. (1965), *Reacţia de hemaglutininhibare în diagnosticul enterovirozelor*. In vol. Congr. Naţ. Microbiol., 15—18 sept., p. 4.

CIUGARIN M., MANIŢIU M., IONESCU B. (1966), *Reacţia de hemaglutininhibare în diagnosticul enterovirozelor*, St. Cerc. Inframicrobiol., **17**, *3*, 189—193.

CIUGARIN-BRĂILOIU M., CIUGLEA M., PREDESCU I., RĂDULESCU P. (1971), *Aspecte ale viremiei în unele infecţii enterovirale*, St. Cerc. Inframicrobiol., **22**, *1*, 3—17.

CIUGARIN-BRĂILOIU M. (1975), *Variations in Coxsackievirus pathogenicity in the course of routine isolations in suckling mice and cell cultures*, Rev. roum. Med. Virol., **26**, *2*, 81—86.

COMBIESCU M. et al (1971), *Problema etiologiei în neurovirozele de origine prezumtiv enterovirală* ,In vol. : Al II-lea Congr. Nat. Microbiol. Med., Bucureşti, 15—17 sept., p.144.

COTOR F., HAIMOVICI M., IVAN A., DIMITRIU G., ZAVATE O. (1978), *Infecţii respiratorii acute estivale asociate cu enterovirusuri nepoliomielitice*, Rev. med. — chir. Iaşi, **82**, *1*, 63—67.

CUPCOVA E. (1975), *Dôkaz protilátok proti virusom Coxsackie A, B, a ECHO v ludskych sérach metódom dvojsmernej imunodifúzie v agarovom géle. I. Precipitacné protilátky protivirusom Coxsackie skupiny B*, Cs. Epidemiol. Microbiol. Immunol., **24**, *5*, 270–274.

DENOYEL G. A., PEYRAMOND D. (1980), *Le diagnostic virologique : état actuel, indication, intérêt*, Cah. méd., *5*, **29**, 1741–1746.

DODONOVA N. N., TETLIN E. M., SCEKOCINA E. A., OMELCENKO T. M., KONOVALOVA O. M. (1975), *Prigotovlenie i izucenie referens-stvorotok c enterovirusuam grupt Coxsackie B*. In. : *Standardt, stamm i metodt controlea virus, bacteriin, preparatov i allergenov*, Vâp. *I.M.*, 71–73.

DÖRRIES R., TER-MEULEN V., (1979), *Detection of virus specific IgM antibodies in enterovirus infections by radioimmunoassay*, Europ. Ass. against virus diseases. Vol. Papers and Posters, Munich, Sheraton Congress Center, Sept. 5–7, 67.

DÖRRIES R., TER MEULEN (1981), *Virus specific IgG and IgM response in human ECHO- and Coxsackie - virus B infections*, XVIIIth Symp. Europ. Ass. against virus Diseases, Stirling, 31 august – 4 september.

DUCA E., TOMESCU E., DUCA M., BOȚAN A. (1958), *Imunizarea șoarecelui alb cu virusuri Coxsackie în vederea obținerii de ser hiperimun*. In vol. : Conf. Interreg. de poliomielită și enterovirusuri, 22–24 mai, Vatra-Dornei, p. 60.

DUCA M. (1979), *Probleme și posibilități actuale în diagnosticul de laborator al infecțiilor virale*, Bacteriol. **24**, *2*, 65–80.

DUCA M. (1979), *Virologie medicală*. În : *Microbiologie medicală* de E. DUCA, M. DUCA și G. FURTUNESCU, Edit. didactică și pedagogică, București.

DUMITRESCU S. M. (1979), *Studii de microscopie electronică efectuate în Institutul de virusologie „Ștefan S. Nicolau"*. In vol. : Abstr. of Works of the « Șt. S. Nicolau » Institute of Virology, București, pp. 28–29.

EKDOM VAN L.T.S., VERSTEEG J., VAN GEMERT G. W. (1979), *Coxsackie A-viruses : preparation of antisera in mice*. In vol. : Abstr. Papers and Posters, Munich, Sheraton Congress Center, sept. 5–7, p. 92.

EL-HAGRASSY M.M.O., BANATVALA J. E., COLTART D. J. (1980), *Coxsackie B virus specific IgM responses in patients with cardiac and other diseases*, Lancet, **II**, *8205*, 1160.

EL-HAGRASSY M.M.O., BANATVALA J. E. (1981), *An ELISA test for detecting Coxsackie-B virus-specific IgM responses in patients with cardiac and non-cardiac disease*, VIIIth Symp. Europ. Ass. against Virus Diseases, Stirling, 31 August–4 September.

ENGLER R., KEAIRNES P. (1971), *Effect of the purification of virus antigens on the production of specific complement-fixing antibodies*, Appl. Microbiol., **21**, *4*, 653–656.

FRENCK M. L., SCHMIDT M. J., EMMONS R. W., LENNETTE E. H. (1972), *Immunofluorescence staining of group B Coxsackie virus*, Appl. Microbiol., **23**, *1*, 54–61.

GARDNER P. S., (1977), *Virus diagnostic procedures in clinical virology*, Experientia, **33**, *12*, 1674–1676.

GARDNER P. S. (1978), *European Group for laboratory viral diagnosis*. Amsterdam Symposium on rapid diagnosis, J. gen. Virol., **39**, *1*, 201–203.

GASPAR A., EDLINGER E. (1978), *Diagnostic rapide des entérovirus par électrosynérèse*, Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), **129**, *4*, 545–552.

GAUDIN O. G. (1964), *Les infections à entérovirus*. In : *Diagnostic des malades à virus* de R. Sohier, Ed. Flammarion, Paris, p. 608–612.

GAUDIN O. G., BRINGUIER J. P., BRIGAUD M., TERRAILLON J., SOHIER R. (1971), *Réponse immunitaire de trois espèces animales (cobayes, hamsters, souris) à différents Coxsackie virus A. I. Étude comparée des anticorps fixant de complément*, Ann. Inst. Pasteur, **120**, *2*, 228–242.

GEMERT VON G. W., PETERS A.C.B., VERSTEEG I., (1979), *Coxsackie B meningitis diagnosis by immunofluorescence of cerebrospinal fluid cells, complement fixation and microneutralization ; Europ. Association against virus diseases*. In vol. Abstr. Papers and Posters, Sheraton Congress-Center, Munich, sept. 5–7 p. 93.

GOLUB M. F., SUPTEL E. A., BURVIKOVA V. J., RADOLITKAIA L. S. (1972), *Voprost. virusologhiceskoi i serologhicescoi diagnostichi enterovirusnih infecții*, Vopr. Virusol., **17**, *2*, 203–206.

GOTTARDI W. (1978), *Usability of N-Iodo-Compounds as Disinfectants*, Zblt. Bakt. Infekt. Hyg., **167**, *3*, 216–224.

GRIST N. R. (1981), *Safety and danger in the virus laboratory.*, XVIIIth Symp. Europ. Ass. against Virus Diseases, Stirling, 31 august – 4 september.

HATCH M. H., MARCHETTI G.E.A. (1975), *A comparative study of agar overlay and standard tissue culture methods for isolation of enteroviruses*, Publ. Health. Rep., **80**, *1*, 29–33.

Scanned with OKEN Scanner

TABER L. H., MIRKOVIC R. R., ADAM R. R., ELLIS S. S., YOW M. D., MELNICK J. L. (1973), *Rapid diagnosis of enterovirus meningitis by immunofluorescent staining of CSF leukocytes*, Intervirology, *1*, 127—334.

TSOTSOS A.S.A. (1974), *Identification and Typing of Viruses and Detection of Antiviral Antibodies by Counterimmunoelectrophoresis*, Path. Microbiol. (Basel), **41**, *6*, 297—310.

VĂȚĂ A., ZAVATE O., COTOR F., DIMITRIU S., SCURTU C., HAIMOVICI M., IVAN A., BĂRZU B., DĂNILĂ F. (1980), *Clinical polymorphism of diseases caused by non-poliomyelitis enteroviruses*, Arch. Path. exp. Microbiol., **39**, *3*, 221—228.

VOICULESCU C. (1966), *Dificultăți în seroneutralizarea virusurilor ECHO*, Microbiol. Parazitol. Epidemiol., **11**, *1*, 23—30.

VOICULESCU C., CIPLEA A. G., CONSTANTINESCU P. (1971), *Valeur des recherches électronoptiques dans l'étude du pouvoir pathogène et immunogène de souches de virus Coxsacke A 10 chez les souris jeunes*, Arch. roum. path. ex. Microbiol., **30**, *3—4*, 377—387.

VOICULESCU C. (1976), *Cultura celulară în diagnosticul virozelor umane*, Edit. medicală, București.

VOICULESCU C., SCHÖFFEND L. (1978), *Corelarea testelor pentru contaminanți biochimici și de eficiență în controlul serului de vițel destinat mediilor de creștere a culturilor celulare*, Bacteriol., Virusol. Parazitol. Epidemiol. **23**, *1*, 47—54.

VRIJSEN F., BRIOEN P., BOEYE A. (1980), *Identification of poliovirus precursor proteins by immunoprecipitation*, Virology, **107**, *2*, 567—569.

VOLLER A., BIDWELL D. E., BARTLETT A. (1976), *Enzyme immunoassay in diagnostic medicine*, Bull. W.H.O., **53**, *1*, 55—65.

VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D. G. (1978), *The use of the enzyme-linked immunosorbent assay in the serology of viral and parasitic Diseases*, Scand. J. Immunol., **8**, supl. *7*, 125—129.

YOLKEN R. H., TORSCH V. (1980a), *Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and identification of Coxsackie B antigen in tissue cultures and clinical specimens*, J. Med. Virol., **6**, *1*, 45—52.

YOLKEN R. H., TORSCH V. M. (1980 b), *Enzime-linked imunosorbent assay (ELISA) for detection and identification of Coxsackie A viruses*. In : Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington D.C., p. 263.

YOLKEN R. H., TORSCH V. M. (1981), *Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and identification of Coxsackie virus A*, Infec. Immun., **31**, *2*, 742—750.

ZAIKOVA T. P., SIROBOKOV V. P. (1975), *Immunofluorescentroe izucenie rannih stadii reproducții virusov Coxsackie v kulturah kletok*. In : Virusî i virus. zabolevanie, Resp. mejved. sb., Vip. 3, pp. 93—95.

ZAKIROVA S. F., SERGHEEV A. G., VENEDIKTOVA N. I., NIKULINA N. V., POSLIAKOVA O. A., GORBUNOVA G. G. (1980), *Primenenie reakții nepreamoi ghemagglutinații dlia diagnostiki enterovirusnih infecții*, Virusn. infecții, etiol., epidemiol., klinika, patoghenez. i diagnostic, Sverdlovsk, pp. 80—83.

ZALESSKIH A. F., ANTUPOVA A. G., RAZUMOV I. A. (1979), *Metod vstrecinogo immunoelectroforeza v laboratornoi diagnostike enterovirusnih infecții*, Biofiz. microorganizmov i immunochimia,. Gorkii, 124—126.

ZAVATE O., AVRAM G., BÎRZU N., GALACTION E., VIRNA GH. (1971), *Virusurile ECHO în masa populației și la bolnavi*, Rev. med.-chir. Iași, **75**, *1*, 111—117.

ZAVATE O., GALACTION E., AVRAM G., BÎRZU N., VIRNA GH., IRINESCU A. (1973), *Potentiel épidémiologique des entérovirus en Moldavie*, Arch. roum. Path. exp Microbiol., **32**, *4*, 593—602.

ZAVATE O., IRINESCU A., VIRNA GH., SCURTU C. (1974), *Detection of Australia antigen in blood samples collected on filter paper disk*, Rev. med.—chir. Iași, **78**, *2*, 443—446.

ZAVATE O., IVAN A., AVRAM G., COTOR F., VASILIU D., IRINESCU A. (1976a), *Enteroviral etiology of some outbreaks in a zone of Romania*, Rev. roum. Med. Virol., **27**, *1*, 55—59.

ZAVATE O., COTOR F., IVAN A. (1976b), *Epidemic outbreak of Coxsackie virus meningitis. Note II. Virological and serological investigations*, Rev. roum. Med. Virol., **27**, *4*, 289—292.

ZAVATE O., COTOR F., IVAN A., TIRON S., AVRAM G. (1980), *Investigations on the circulation of enterovirus in a children community*, Rev. roum. Med. Virol., 1980, **31**, *4*, 289—293.

ZEIPEL VON G. (1978), *Disaggregation in strains of EV71 and ECHO-virus type 4 after propagation in human RD-cells*. In vol. : Congr. Intern. Infect. Parasit.Diseases, Varna, 2—6 oct., *p. 589—391*.

ZEIPEL VON G. (1979), *Neutralization of aggregated strains of enterovirus 71 and ECHO virus type 4 in RD and VERO or GMK—AH 1 cells*, Acta path. microbiol. scand., sect. B, **87**, 71—73.

Scanned with OKEN Scanner

ENTEROVIRUSURILE NEPOLIOMIELITICE ÎN MEDIUL AMBIANT

Poluarea virală a mediului ambiant a constituit mult timp o problemă puțin studiată din cauza dificultăților legate de metodele de detectare a virusurilor în diferite elemente din mediul ambiant.

Marea majoritate a virusurilor nu rezistă în mediul extern, multiplicarea lor fiind strict condiționată de prezența unui substrat viu. Totuși, unele virusuri, printre care în primul rînd enterovirusurile, se particularizează prin posibilitatea supraviețuirii îndelungate în diferite elemente ale mediului ambiant, de unde posibilitatea transmiterii lor la omul receptiv.

Așa cum reiese din figura 5.1 enterovirusurile eliminate de omul bolnav sau de purtătorul sănătos pot polua aerul, solul, apa, alimentele și diferitele obiecte din mediul ambiant. În plus, există posibilitatea contaminării reciproce a diferitelor elemente ale mediului ambiant. Astfel, enterovirusurile dintr-o apă contaminată pot pătrunde în sol, alimente și în aer, sub formă de aerosoli în cazul irigațiilor. De asemenea, enterovirusurile din sol pot contamina apa de suprafață sau freatică, diferite alimente în special legumele care se cultivă pe solul respectiv, precum și aerul sub formă de pulberi.

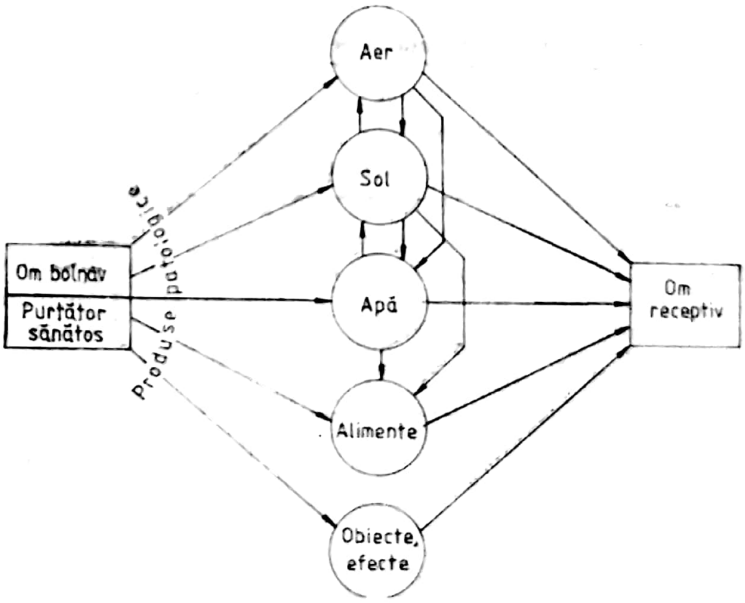


Fig. 5.1. —Modalități de transmitere a enterovirusurilor prin elementele mediului ambiant.

Ca urmare a îmbunătățirii metodologiei de lucru, în ultimii ani a apărut un număr însemnat de cercetări consacrate elucidării condițiilor de circulație a enterovirusurilor în mediul extern, în special în apă, și a rolului lor în morbiditatea omului (Steinmann, 1977; O.M.S., 1979; Zamfir, 1979; Feachem și colab., 1981). După Drozdov și Kazanțeva

(1981) aprecierea gradului de răspîndire a virusurilor în mediul ambiant este importantă nu numai pentru soluţionarea problemelor de ocrotirea sănătăţii omului, dar şi pentru elaborarea corectă a măsurilor care să asocieze rezolvarea problemelor de sănătate publică cu cele de protecţie a naturii.

În ţara noastră, Cajal (1978), Copelovici şi Iftimovici (1978) şi Nestor (1979) s-au preocupat, la rîndul lor, de prezenţa virusurilor în mediul ambiant şi de menţinerea echilibrelor ecosistemelor.

5.1. ENTEROVIRUSURILE NEPOLIOMIELITICE ÎN APĂ

Problema poluării enterovirale a apei, aşa cum am arătat, este în stadiul actual cea mai bine studiată, literatura de specialitate din ultimii ani abundînd în materiale privind prezenţa enterovirusurilor în diferite categorii de apă, metodele de evidenţiere, studiile experimentale asupra duratei de supravieţuire în apă şi metodele de îndepărtare a enterovirusurilor din apă (Melnick şi colab., 1978; Mayr, 1980; Morris şi Waite, 1981; Feachem şi colab., 1981; Sarlot şi Stavskii, 1982).

Importanţa problemei este cu atît mai mare cu cît în unele zone ale globului creşterea continuă a consumului de apă de către populaţie şi dezvoltarea industrială fac inevitabilă refolosirea apelor reziduale, de unde necesitatea cunoaşterii potenţialului epidemiologic al virusurilor din apă şi a eficienţei metodelor de îndepărtare a acestora.

După Melnick şi colab. (1978) prin fecalele umane pot fi excretate peste 100 de diferite virusuri enterice redate în tabelul 5.1 odată cu bolile

Tabelul 5.1

Virusurile enterice umane ce pot fi prezente în apă (Melnick şi colab., 1978)

Grupul de virusuri	Nr. serotipuri	Boală sau simptome cauzate
Enterovirusuri		
Poliovirus	3	Paralizie, meningită, febră
Virus ECHO	34	Meningită, boală respiratorie, erupţie, diaree, febră
Virus Coxsackie A	24	Herpangină, boală respiratorie, meningită, febră
Virus Coxsackie B	6	Miocardită, anomalii congenitale cardiace, erupţie, febră, meningită, boală respiratorie, pleurodinie
Enterovirusuri noi	4	Meningită, encefalită, boală respiratorie, conjunctivite hemoragice acute, febră
Hepatită tip A (probabil un enterovirus)	1	Hepatită infecţioasă
Gastroenterită tip A (probabil un enterovirus)	2	Vomă epidemică şi diree, febră
Rotavirus (fam. reovirus) (gastroenterita tip B)	?	Vomă epidemică şi diree, mai ales la copii
Reovirus	3	Nestabilit în mod clar
Adenovirus	>30	Boală respiratorie, infecţii oculare
Parvovirus Virus adeno-asociat	3	Asociat cu boală respiratorie la copii dar cu etiologie neclarificată

Scanned with OKEN Scanner

sau simptomele clinice determinate de acestea. Se poate observa că enterovirusurile ocupă primul loc în ceea ce privește frecvența serotipurilor și multitudinea formelor clinice de îmbolnăvire determinate.

Aceiași autori prezintă într-o schemă sugestivă multiplele căi de transmitere a virusurilor intestinale din apă (fig. 5.2). Materiile fecale conținînd enterovirusuri pot contamina apele de șiroire, apele menajere sau reziduurile solide. De aici, enterovirusurile se pot regăsi în apa de mare,

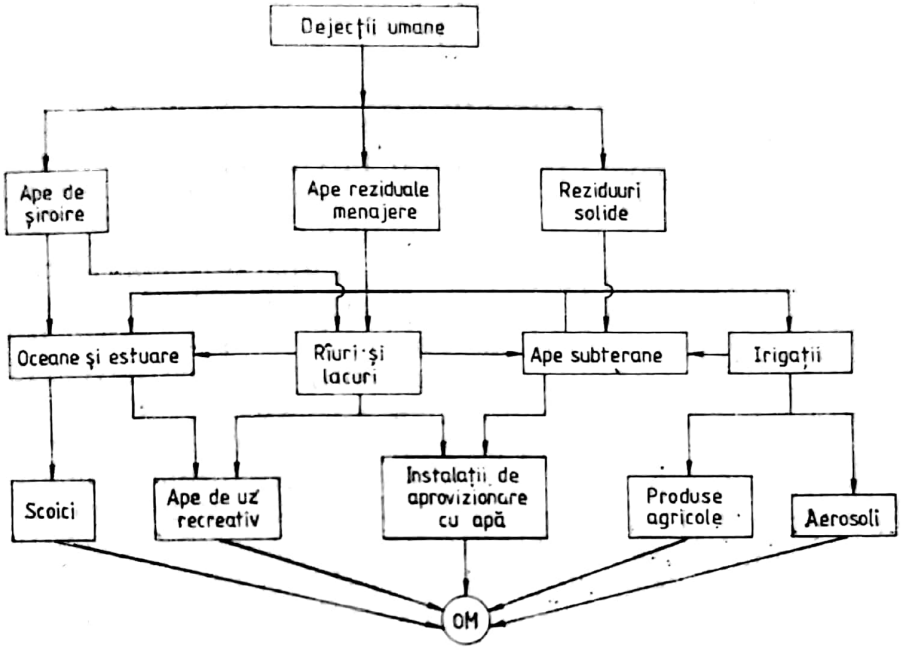


Fig. 5.2. — Rolul apei în transmiterea enterovirusurilor (după Melnick și colab., 1978).

în rîuri, lacuri, apele subterane și, în final, chiar și în apa potabilă. În plus, contaminarea omului receptiv se mai poate realiza indirect prin ape utilizate în scop recreativ, prin aerosoli în cazul folosirii apelor reziduale pentru irigații și pe cale alimentară prin consum de scoici sau legume irigate cu apă contaminată, așa cum vom arăta în continuare.

5.1.1. ÎMBOLNĂVIRI HIDRICE DETERMINATE DE ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE

Spre deosebire de epidemiile de poliomielită transmise pe cale hidrică și descrise în trecut, înaintea aplicării vaccinării antipoliomielitice, epidemiile hidrice determinate de enterovirusurile nepoliomielitice și semnalate în literatura de specialitate sînt extrem de rare. Cităm o epidemie descrisă de Hawley și colab. (1973) determinată de virusul Coxsackie B5 printre copiii dintr-o colonie, care s-au scăldat în apa lacului Champlain. Copiii bolnavi au prezentat meningită și conjunctivită. Virusul a fost izolat atît din materiile fecale și exsudatul faringian de la copii, cît și din apa lacului respectiv. În anul 1982, Hejkal și colab. au descris, la rîndul lor, o epidemie de afecțiuni gastroenterale determinate de enterovirusuri și legate de consumul apei potabile. Keswick și Gerba (1980) au arătat că 356 (65%) din 550 de epidemii hidrice din S.U.A. în perioada 1946—1977 au fost aso-

Scanned with OKEN Scanner

ciate cu enterovirusuri (inclusiv hepatita virală tip A). După acești autori, numărul epidemiilor hidrice trebuie să fie mai mare dacă ținem seama de dificultățile în precizarea etiologiei enterovirale a unora din aceste epidemii datorită nespecificității și polimorfismului sindroamelor clinice și frecvenței formelor inaparente care trec neobservate în cadrul unei anchete epidemiologice. Se consideră că doar o singură persoană din 100 infectate cu poliovirus și din 1 000 cu virusurile Coxsackie și ECHO prezintă fenomene clinice manifeste.

Pentru ca unele îmbolnăviri să poată fi atribuite poluării virale a apei este necesar : a se stabili o diferență semnificativă între morbiditatea care atinge persoanele expuse sursei de apă contaminată și cea observată la persoane care nu au avut nici un contact cu sursa respectivă ; a se elimina orice alt factor ce poate fi suspectat în etiologia îmbolnăvirilor respective și a se încadra îmbolnăvirile în perioada de incubație a infecțiilor enterovirale, condiții care adesea sînt dificil de realizat.

În acest context, riscul poluării virale a apei este considerat de unii autori ca fiind crescut, în timp ce alții îl subapreciază bazîndu-se pe cantitatea redusă de virus existentă în mod obișnuit în apă. Totuși, persoanele infectate în acest fel pot face afecțiuni asimptomatice devenind purtătoare și contaminînd prin contact direct alte contingente de receptivi. În plus, în stadiul actual nu există încă metode sigure și sensibile de detectare a enterovirusurilor în apă, ceea ce face ca riscul epidemiologic să fie și mai greu de sesizat. De-a lungul timpului au existat numeroase discuții asupra numărului de particule virale din apa potabilă ce ar constitui doza infectantă pentru om. Melnick și colab. (1978) și experții O.M.S. (1979) consideră că prezența unei singure unități infectante într-o probă de apă potabilă presupune posibilitatea unei îmbolnăviri. S-a calculat că într-un oraș de 1 milion de locuitori care consumă în medie 1 litru de apă potabilă zilnic avînd ipotetic o unitate infectantă de virus la 20 litri, 50 000 de persoane vor ingera cel puțin o unitate infectantă pe zi. Dacă ținem seama de starea de imunitate și de alți factori de rezistență, se consideră că doar 1 % din persoanele expuse se vor infecta ; în același oraș vor fi 500 de persoane infectate pe zi și 182 500 pe an, toate constituind surse potențiale de infecție. Presupunînd că dintre aceștia doar 1 din 50 vor face boala manifestă, se vor îmbolnăvi 3 650 de persoane pe an. Aceste cifre reflectă clar importanța epidemiologică a poluării virale a apei și justifică întru totul preocupările susținute privind perfecționarea măsurilor de îndepărtare a enterovirusurilor din diferite categorii de apă.

5.1.2. METODELE DE EVIDENȚIERE A ENTEROVIRUSURILOR NEPOLIOMIELITICE ÎN APĂ

Punerea la punct a unor metode cît mai sensibile, specifice și accesibile pentru evidențierea enterovirusurilor în apă constituie în prezent o problemă esențială de care depinde cunoașterea reală a rolului apei în transmiterea infecțiilor enterovirale. Numeroase colective se preocupă de cercetările în acest domeniu, ceea ce se reflectă în literatura de specialitate printr-un enorm material bibliografic a cărui expunere depășește posibilitățile lucrării de față. În consecință, vor fi prezentate doar principiile diferitelor metode, în special ale celor de concentrare care reprezintă esența metodelor de detectare a enterovirusurilor, cîteva exemple din fiecare

Scanned with OKEN Scanner

grup de metode şi o evaluare a eficienţei lor în raport cu diferitele categorii de apă.

De la bun început trebuie să accentuăm că, în stadiul actual nu se poate conta pe anumite metode de evidenţiere a enterovirusurilor cu aplicaţie universală pentru toate categoriile de apă, ci apare necesară o adaptare diferenţiată a acestora în raport cu încărcătura de virus a apei, tipurile antigenice predominante, rezistenţa lor faţă de agenţii fizici şi chimici şi faţă de substanţele dezinfectante, gradul de turbiditate, cantitatea de materii organice, timpul necesar de lucru pentru concentrare, ca şi în raport cu aparatura, costul etc.

Punerea în evidenţă a enterovirusurilor în apă se realizează în trei etape : recoltarea probelor, concentrarea lor în vederea reducerii volumului şi inocularea pe gazde de laborator. În acest capitol vom insista numai asupra primelor două etape, cea de-a treia fiind similară cu orice inoculare de produs patologic în vederea izolării de enterovirusuri aşa cum s-a descris în capitolele precedente.

5.1.2.1. **Metode de recoltare**. Plecînd de la premisa că o singură unitate infectantă de enterovirus este suficientă pentru a determina infecţia la om, volumul probelor recoltate trebuie să asigure cuprinderea acestei unităţi infectante. În consecinţă, volumul de apă pentru o probă care urmează să treacă printr-o serie de prelucrări succesive de concentrare, eluare etc. se rezolvă deocamdată intuitiv în raport cu gradul estimat de poluare a apelor respective, el variind între 10 şi 400 litri.

În ceea ce priveşte ritmul de recoltare, în practică se poate recurge fie la probe unice, momentane, fie la probe de 24 de ore obţinute prin recoltări continui sau discontinui repetate la intervale programate, fie, în sfîrşit, la probe de mai multe zile la rînd pentru a surprinde prezenţa enterovirusurilor în cazul unor poluări intermitente.

Probele se recoltează respectînd, ca şi la examenele bacteriologice, măsurile de prevenire a suprainfecţiilor : sterilitatea vaselor, asepsia manoperelor etc.

Redăm în continuare tehnicile de recoltare recomandate în ţara noastră de Nestor (1977) pentru diferite categorii de ape :

— *Din apele reziduale* recoltarea se poate face cu tampon tip Moore confecţionat din tifon, cu latura de 1 m, împăturit sub formă de perniţă cu lungimea de 25 cm şi lăţimea de aproximativ 10 cm, cusut pe margini şi legat la un capăt cu sfoară; tamponul se împachetează în hîrtie şi se sterilizează la autoclav; pentru recoltarea probei se introduce în apa de canal, fixîndu-se cu sfoara pe timp de 24 de ore, după care se scoate şi se introduce într-o pungă de plastic sau într-un borcan de sticlă. Recoltarea se mai poate face în sticle de 100 ml—10 litri în aceeaşi condiţii ca pentru examenele bacteriologice.

— *Din apele de suprafaţă* (*rîuri*, *lacuri*, *ape litorale*, *marine sau de piscină*) recoltarea se face de asemenea cu tampoane de tifon sau în sticle de volum mai mare de 5—10—50 litri. Pentru a se menţine la 15—30 cm sub apă, tamponul va fi prevăzut la unul din capete cu o greutate; mai pot fi efectuate recoltări momentane aşezîndu-se tamponul într-o pîlnie şi turnîndu-se cu căldarea cantitatea de apă dorită.

— *Apa de robinet* se recoltează de asemenea cu tampoane de tifon, introduse într-o pîlnie de sticlă de formă cilindrică, care se fixează cu sfoară la robinetul de apă, după ce s-a făcut asepsia acestuia; se lasă să treacă prin tamponul de tifon 100 litri de apă sau mai mult, volumul

Scanned with OKEN Scanner

fiind determinat cu un apometru sau pe baza vitezei de scurgere a apei; apa de fîntînă sau din rezervoare cu apă clorinată din uzine se recoltează cu o pompă sau un vas steril și se filtrează prin tamponul așezat într-o pîlnie. Întrucît pentru apa potabilă, în care cantitatea de virus este mică, metoda de recoltare cu tamponul nu este totdeauna eficientă, au fost propuse diferite tipuri de aparate recoltoare în acest scop (Wang și colab., 1980).

Probele de apă recoltate se transportă în cel mai scurt timp la laborator în lăzi izoterme cu gheață sau zăpadă carbonică și se stochează în congelator pînă la punerea în lucru la —20°C sau, de preferat, la —70°C, la care temperatură sînt distruse totodată și unele enzime sau substanțe cu acțiune inactivantă asupra virusurilor.

5.1.2.2. **Metode de concentrare.** Inocularea directă a probelor de apă, fără o concentrare prealabilă, este foarte rar indicată numai pentru categoriile de apă puternic contaminate. În rest, izolarea enterovirusurilor nu este posibilă decît după aplicarea unor procedee de concentrare de cel puțin 20—30 de ori față de volumul inițial, ceea ce asigură ipotetic includerea în inocularea finală a cel puțin unei doze infectante, capabile să infecteze gazda de laborator.

Din aplicarea unei mari varietăți de procedee de concentrare au rezultat o serie de noțiuni generale care trebuie respectate pentru a se obține rezultate optime în izolarea enterovirusurilor din volume mari de apă. Astfel, trebuie să se țină seama că particulele virale aflate în mediul apos sînt de multe ori înglobate în diverse substanțe organice, în special în celulele sau țesuturile în care s-au multiplicat și care continuă să exercite un rol protector față de agenții fizici și chimici din mediul ambiant, favorizînd și gradul lor de rezistență în desfășurarea procedeelor de concentrare. În practică, încorporarea prealabilă a virusurilor în unele substanțe protectoare, cum ar fi coloizii stabilizatori (proteina sanguină, serul de cal etc.), le mărește capacitatea de supraviețuire și împiedică inactivarea lor în cursul prelucrărilor prelungite de concentrare a probelor. Variațiile de temperatură, radiațiile solare sau prezența substanțelor oxidante pot determina denaturarea sau distrugerea virusurilor enterice. Pentru toate aceste motive se recomandă ca operațiile de concentrare să nu dureze mult timp, probele de apă să fie menținute la o temperatură scăzută iar concentratele obținute să fie congelate imediat, stare în care enterovirusurile pot fi conservate luni de zile.

În general, enterovirusurile sînt rezistente la variațiile pH-ului, dar numai între anumite limite. Ca urmare, trebuie evitate schimbările extreme și bruște ale pH-ului și ale concentrațiilor molare, iar soluțiile tampon folosite să fie suficient de distanțate de punctul izoelectric al virusului spre a se evita precipitarea și deci scoaterea inoportună a acestuia din soluție.

Cu ocazia cercetărilor au fost construite mai multe dispozitive și aparate care să înlesnească concentrarea virusurilor din volume cît mai mari de apă de orice proveniență (Schwartzbrod și Lucena-Gutierrez, 1978; Vilagines și colab., 1979; Berman și colab., 1980; Payment și Trudel, 1981).

În mod schematic, variatele metode de concentrare se pot grupa în procedee fizice, chimice și biologice, dar în majoritatea cazurilor aceste metode se combină între ele pentru atingerea scopului final.

Scanned with OKEN Scanner

a) *Metode fizice și chimice.* Numeroase metode fizice, propuse în anii anteriori, ca evaporarea, congelarea, centrifugarea etc. sînt folosite mai mult ca adjuvanți, unele din ele fiind descrise mai detaliat în lucrări consacrate acestui subiect (Leloup și colab., 1979).

Centrifugarea are ca scop îndepărtarea prealabilă a materiilor grosiere în special din apele intens poluate. Partea sedimentată se înlătură iar supernatantul se centrifughează din nou la 15 000 t/min timp de 15—60 minute la +4°C pentru îndepărtarea florei microbiene. După aceste faze se poate face *ultracentrifugarea* la viteze mari 20—50 000 t/m care permit sedimentarea particulelor virale din soluție, deci concentrarea lor într-o formă mult mai purificată. Potențialul de sedimentare și coeziune a sedimentului poate fi îmbunătățit prin adăugarea a 1 ml gelatină 2,4% pentru fiecare fracțiune de 40 ml probă de concentrat.

Metoda de concentrare în sistem bifazic pusă la punct de Albertsson (1974) se bazează pe separarea particulelor virale în mediul apos format într-un sistem de două lichide nemiscibile. Se utilizează fazele apoase constituite prin combinarea a doi polimeri de sinteză cu greutate moleculară mare: dextransulfat de sodiu și polietilenglicolul sau dextran și metilceluloză. Fiind amestecate în anumite concentrații bine stabilite, la un anumit pH și la un grad stabilit de ionizare a mediului, acești polimeri solubili dau naștere după agitare și decantare la un sistem nemiscibil de două faze lichide, virusurile concentrîndu-se în faza inferioară. Pentru volumele mari de apă, însă, randamentul metodei este inconstant, variind între 5% și 100% (Fattal și colab., 1974).Dacă încărcătura virală este sub 10 unități infectante/litru se propune o a doua separație în sistem bifazic (O.M.S., 1979). Metoda poate fi utilizată și ca etapă finală în procedeele combinate de concentrație pentru volume mari de apă.

Metoda este simplă, nu necesită utilaj complicat dar rezultatele sînt inconstante dacă nu se respectă riguros condițiile de pH, sarcină ionică și concentrație a sărurilor. Nu este recomandabilă pentru apa de mare (Pietri, 1977). În plus, s-a demonstrat că virusurile Coxsackie tip B2 și ECHO tip 6 sînt inhibate de dextransulfat.

Adsorbția este un proces fizic de alipire a particulelor fine inclusiv a virusurilor aflate în suspensie pe suprafața unui solid sau a unui sistem coloidal. Virusurile pot fi adsorbite fie prin adăugarea la proba de apă a adsorbantului sub formă de praf și apoi separarea sa prin centrifugare sau filtrare, fie prin trecerea probei de apă prin filtre formate dintr-un material adsorbant care apoi se eluează cu diverse soluții alcaline sau bogate în proteină fiind astfel concentrate într-un volum mic de suspensie din care virusurile pot fi apoi izolate. Procedeele de filtrare vor fi tratate în paragrafele următoare.

Eficiența metodelor de concentrare prin adsorbție/eluție depinde în special de eluție. Kalter și Millstein (1974) accentuează că, în timp ce adsorbția reușește întotdeauna, eluția ridică unele probleme legate în special de necesitatea asigurării unui pH alcalin prin mijloace care să nu afecteze viabilitatea virusurilor. După autorii de mai sus, eluenții cei mai eficienți pentru enterovirusuri au fost caseina 2% în 0,05 M tampon Tris (pH 8,3) și serul de vițel 10% în 0,05 M soluție de barbitol sau 0,05 M tampon de săruri de borat. Se mai utilizează bulion 0,5% la pH 8,5, tampon alcalin, tampon glicină la pH 10,5—11,5 (Laveran și colab., 1976; Farrah și colab., 1978; Gerba și colab., 1978; Hurst și colab., 1978).

Scanned with OKEN Scanner

Dintre materialele folosite în mod curent pentru adsorbția virusurilor cităm polielectroliții insolubili, compușii organici sau anorganici cu proprietăți adsorbante, praful de sticlă, fibrele, microfibrele sau microbilele de sticlă, țesăturile de bumbac (tifon).

Utilizarea *polielectroliților* este bazată pe principiul de adsorbție a virusului pe rășini schimbătoare de ioni urmată de eluția lor. Cel mai frecvent utilizat este PE 60 (copolimer al anhidridei maleice fin pulverizat), proporția de recuperare variind între 40 și 99% din virusul inițial, în funcție de volum, pH și cantitatea de materii organice din apa de cercetat (Kalter și Millstein, 1974). Grigorieva și Korceak (1977) au utilizat cu aceleași rezultate un ionit sovietic (AB 17), accentuînd că metoda este avantajoasă pentru toate categoriile de ape cu excepția apei de mare în care folosirea electroliților este compromisă din cauza mineralizării ridicate a apei marine. Metoda a fost utilizată larg și în țara noastră de Nestor și colab. (1978 a) pentru izolarea enterovirusurilor din apa de canal și apa de suprafață.

Pentru concentrarea enterovirusurilor din apă au fost utilizate substanțe anorganice, în special săruri cationice polivalente (hidroxid de aluminiu, sulfat de amoniu, clorură de aluminiu, săruri de zinc, oxid de fier etc.) sau substanțe organice (dextran + sulfat de sodiu, polietilenglicol, fluorocarbon). Concentrarea virusurilor se poate realiza fie prin trecerea apei printr-o coloană cu aceste substanțe, fie — de preferat — prin adăugarea lor *in situ* pentru a forma flocoane.

Dintre *compușii anorganici*, cel mai larg utilizat este sulfatul de amoniu care este introdus în apa de cercetat în cantitate măsurată pînă la obținerea unei soluții semisaturate. Precipitatul format este lăsat să se sedimenteze și apoi virusurile se recuperează în vederea dializei. Grigorieva și Korceak (1977), după ce adaugă la proba de apă ser normal de cal 10%, o saturează cu eter etilic pentru decontaminare, apoi adaugă sulfatul de amoniu ca substanță precipitantă. Acest amestec se separă prin centrifugare în trei straturi: eter, ser și soluție saturată de sulfat de amoniu. Virusurile se recuperează din stratul mijlociu de ser, aplicînd principiul dializei.

Un alt compus anorganic frecvent utilizat este hidroxidul de aluminiu care are proprietatea de a forma precipitate care adsorb virusuri. Eluția se face prin modificarea pH-ului.

Farrah și colab. (1978) au folosit pentru izolarea virusurilor din apa de robinet mici cantități de clorură de aluminiu, ceea ce a ameliorat concentrarea virusurilor pe filtrele de membrană. Experimental, proba de 1 000 litri de apă s-a redus la 20—80 ml cu o eficiență de izolare de 70%.

Volumul de probă care poate fi tratat cu săruri cationice polivalente este limitat de masa de precipitat care riscă să colmateze coloana sau să fie prea voluminos pentru a fi tratat prin centrifugare. Eluția precipitatului este asigurată cu ajutorul unei soluții tampon cu pH ridicat sau a unor lichide proteice ca extractul de carne sau ser de făt de vițel cu pH neutru sau ridicat (O.M.S., 1979).

Rao și colab. (1981) au folosit o metodă cu oxid de fier magnetic pentru izolarea virusurilor din apa de robinet ceea ce asigură recuperarea virusului într-o proporție de 60—80%.

Dintre *compușii organici* mai frecvent utilizați cu rezultate bune pentru concentrarea enterovirusurilor menționăm polietilenglicolul (folosit cu succes și pentru dializă), fluorocarbonul etc.

Scanned with OKEN Scanner

Un alt procedeu de adsorbţie constă din trecerea apei de cercetat printr-un strat de fibre de sticlă sau praf de sticlă la un pH acid, cu ajutorul unor aparate speciale (Schwartzbrod şi Lucena-Gutierrez, 1978; Vilagines şi colab., 1979; Rolland şi Block, 1980).

Filtrele de microfibre de sticlă prin care a fost trecută apa de cercetat pot fi expediate prin poştă la laborator, fără nici un dezavantaj (Joret şi Block, 1981).

Sticla fiind încărcată cu sarcini electrostatice negative determină aderarea virusurilor încărcate cu sarcini pozitive. Eluarea de pe aceste materiale s-a realizat la un pH alcalin. Randamentul metodei a fost de aproximativ 50%, ceea ce o face acceptabilă în cercetarea apelor naturale. Pentru apele reziduale nu poate fi utilizată datorită colmatării rapide a coloanei de filtru.

Hugues şi colab. (1979 b), studiind comparativ metodele de adsorbţie pe fibre de sticlă şi pe praf de sticlă, au constatat că proporţia virusului recuperat a fost de 72% şi, respectiv, 94%, deci mai favorabilă utilizării prafului de sticlă.

În 1979, Aizen şi colab. au utilizat pentru adsorbţie fibre polimere ultrafine, iar pentru eluţie soluţie 1 M NaCl în tampon cu glicerol cu pH 11,5. Metoda, simplă, rapidă şi uşor de utilizat în teren, a permis o recuperare a virusului variind între 10 şi 100%.

Metoda tampoanelor de tifon — o formă particulară de adsorbţie-eluţie — a fost folosită iniţial pentru cercetarea salmonelelor din sursele de aprovizionare cu apă. Metoda constă din imersia, timp de mai multe ore, în curenţii de apă de cercetat a unor perniţe de tifon hidrofil împăturite în 16 straturi (după tehnica descrisă în paragraful 5.1.2.1). Adsorbţia pe textura astfel realizată se produce atît pentru flora bacteriană cît şi pentru cea virală, obţinîndu-se o concentrare variind între 10 şi 100 de ori. Randamentul metodei depinde în special de suprafaţa de contact, de temperatura mediului, de durata imersiei şi de debitul apelor în circuit.

Fattal şi Katzenelson (1976) au experimentat această metodă în comparaţie cu altele remarcînd că, în mod paradoxal, eficienţa concentrării virusurilor este invers proporţională cu volumul apei trecute prin tifon. Cu toată eficienţa mediocră şi imposibilitatea aplicării pentru determinări cantitative, această metodă este larg folosită pentru investigaţii epidemiologice de teren datorită aplicării ei simple în practică (Leloup şi colab., 1979; Sekla şi colab., 1980).

În ţara noastră metoda tampoanelor a fost experimentată şi practicată îndelungat de către Nestor la Cluj (1977) în două modalităţi: fie prin cufundarea, cu o greutate, a perniţelor flotante în curentul de apă cercetată, fie prin introducerea lor într-o pîlnie şi filtrarea la nivelul sursei a unui volum fix de apă cercetată, ceea ce permite o oarecare evaluare cantitativă a prezenţei enterovirusurilor în apă. În ambele cazuri, probele aduse în laborator erau tratate cu soluţie de NaOH 10%, pentru eluare la un pH 8,0, apoi erau stoarse, centrifugate la 2 500 t/m şi acidifiate cu acid acetic pînă la pH 5,4. Metoda a fost larg aplicată şi în Institutul de igienă şi sănătate publică Iaşi (Zavate şi colab., 1980; Cotor şi colab., 1981).

Filtrarea constă din trecerea unui lichid printr-un filtru din material poros, care reţine particulele solide aflate în suspensie în cadrul acţiunii unui complex de factori fizici (sarcini electrostatice, tensiune superficială, difuzibilitate, presiune, temperatură), şi eluarea lichidului într-un volum mai mic în vederea inocularii.

Scanned with OKEN Scanner

Filtrarea se poate realiza, după Leloup şi colab. (1979), prin două modalităţi :

— filtrarea în profunzime, prin straturi de diverse materiale poroase în care, deşi diametrul porilor este superior celui al virusurilor, acestea sînt reţinute în filtre datorită fenomenului de adsorbţie ; filtrarea în profunzime, urmată de eluţie, a fost deja descrisă mai sus în cadrul paragrafului privind metode de concentrare bazate pe adsorbţie-eluţie ;

— filtrarea la suprafaţă (ultrafiltrarea) se face prin membrane filtrante cu diametrul porilor inferior celui al virusurilor, acestea fiind reţinute, deci, la suprafaţa filtrelor.

Ultrafiltrarea se poate realiza pe filtre membranoase în stare de gel preparate din nitroceluloză (sub formă de membrane de colodiu, de saci de colodiu sau de hîrtie de filtru impregnată cu colodiu) sau din alginat de aluminiu (Berman şi colab. 1980 ; La France şi colab., 1981). Porozitatea acestor filtre se poate regla prin ajustarea proporţiei elementelor componente : nitroceluloza şi solvenţii acesteia (eter, alcool etilic). După Laveran şi colab. (1976), eficienţa reţinerii virusurilor a variat între 33 şi 45% pentru Coxsackie B2 şi 65—90% pentru poliovirusul tip 1.

Filtrele membranoase celulozice permit examinarea unui volum considerabil de apă însă randamentul lor scade treptat pe măsura colmatajului porilor cu materii în suspensie aflate în lichid. De notat că filtrele membranoase fiind încărcate cu sarcini electrostatice pozitive determină fixarea virusurilor pe membrana filtrantă împiedicînd eluarea lor completă.

Filtrele membranoase de alginat de aluminiu simplifică problema eluării virusurilor deoarece aceste membrane se solvă în soluţie tampon de citrat de sodiu, pierderile fiind minime. Block şi colab. (1976, 1978), referindu-se la eficienţa membranelor solubile de alginat pentru concentrarea enterovirusurilor, au relatat că rezultatele recuperării acestor membrane în condiţii experimentale se situează puţin sub valoarea de 100% în cazul apelor curate, dar nu se pretează pentru apele reziduale deoarece se colmatează. La France şi colab. (1981) au propus filtrarea apei de cercetat printr-o cascadă de membrane de alginat compresat chimic la care se adaugă nişte adjuvanţi ce măresc caracteristicile filtrante ale membranelor (Tween 80, gluconat de sodiu). Pentru volume mari de apă (> 400 litri) au mai fost recomandate metode de concentrare prin filtrare în doi sau chiar trei timpi.

În ultimii ani au luat extindere metodele care utilizează tipuri de filtre încărcate pozitiv cum ar fi cele de hîrtie de filtru plisate (tip Virozorb 1 MDS) propuse de Sobsey şi Glass (1980).

Din studiile comparative asupra eficienţei mai multor metode de concentrare a apei potabile prin filtrare (Hill şi colab., 1976 ; Kazanţeva şi colab., 1978 b ; Joret şi colab., 1980) a reieşit că pentru probele de apă de volum mic, pînă la 5 litri, în care se aşteaptă o încărcătură virală superioară unei unităţi infectante la 1 litru, metodele cele mai recomandate bazate pe adsorbţie pe filtru şi eluţie sînt cele cu filtre din celuloză sau din fibre de sticlă.

După experţii O.M.S. (1979), pentru volumele mari de apă cele mai recomandabile din acest grup de metode sînt : membranele de nitrat de celuloză cu o porozitate de 0,45 mμ ; filtrele de tip cartuş din fibre de sticlă cu o porozitate cuprinsă între 0,45 şi 0,65 mμ. În anumite cazuri este necesară limpezirea apei de cercetat, pentru a se evita colmatarea adsorbantului.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește eluția virusurilor de pe filtre, studii comparative (Farrah și Bitton, 1979) au arătat că eluenții cei mai eficienți de care se dispune în momentul de față sînt: extractul de carne de vită, serul și cazeina, acizii aminați sau alte lichide analoage care intră în competiție cu virusurile pe pozițiile de adsorbție pe corpuri solide.

Alte procedee de concentrare a enterovirusurilor din apă mai puțin utilizate sînt electroforeza, cromatografia și dializa cu polietilenglicol sau polivinilpirolidonă (O.M.S., 1979; Wallis și colab., 1979).

b) *Metode biologice.* Printre metodele biologice utilizate pentru concentrarea enterovirusurilor din apă se încadrează pe de o parte cele care utilizează proteinele serice ca factor adjuvant și, pe de altă parte, cele bazate pe proprietățile biologice, propriu-zise, a unor celule vii.

Din prima categorie de metode cităm pe cele care utilizează albușul de ou, serul inactivat de maimuță, serul normal de bou sau de cal etc.

Bitton și colab. (1979a) au utilizat pentru concentrarea enterovirusurilor din apa de mare și de robinet cazeina și laptele degresat-uscat 1% și tamponat cu glicină la pH 9,0. În condiții experimentale eficiența metodei a fost mai bună pentru poliovirus (recuperare peste 70%) decît pentru virusul ECHO tip 1.

Menționăm în plus metodele de concentrare bazate pe adsorbția virusurilor pe suprafața hematiilor, pe celule de culturi tisulare receptive pentru infecția cu virusurile cercetate, folosindu-se pentru prepararea mediului de cultură însăși apa de examinat. Eficiența acestor metode biologice nu este încă pe deplin precizată în probe experimentale.

Metoda adsorbției pe levuri, elaborată de Nestor (1964, 1967 b, 1977), permite concentrarea enterovirusurilor (Coxsackie, Polio) din volume mari de apă cu ajutorul celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*. Principial, metoda se bazează pe amestecul unei suspensii de levură cu apa de cercetat, care apoi se agită, se filtrează sau se centrifughează. Aplicînd această metodă de concentrare, autorul a obținut rezultate mai bune în comparație cu metoda cu schimbători de ioni și la fel de bune cu cea de adsorbție pe polielectrolitul PE—60 (Monsanto, S.U.A.). Este recomandată în special pentru cercetarea enterovirusurilor în sursele de apă potabilă sau apele pentru înot.

Tabelul 5.2

Reizolarea cu ajutorul precipitatului de vegetale a virusului Coxsackie B5 suspendat în 100 ml de apă
(Konowalchuk și Speirs, 1973)

Planta	Virus
Lăptucă Boston	94
Cicoare	100
Andive	76
Pătrunjel	100
„Rappini"	61
„Swiss chard"	0

Rezultate interesante au fost obținute de Konowalchuk și Speirs (1973) care au utilizat o metodă de concentrare a virusurilor din mediul lichid bazată pe proprietățile de floculare a unor plante. Încercările se referă la extractele din lăptuci, cicoare, pătrunjel, andive ș.a. cu eficiență de recuperare estimată între 60 și 100% (tabelul 5.2).

Scanned with OKEN Scanner

c) *Metode mixte sau combinate.* În realitate, tehnicile de concentrare folosite în mod curent pentru detectarea enterovirusurilor în apă constau în combinarea metodelor fizice, chimice şi biologice dintre care unele de bază şi altele adjuvante. Prezentăm în continuare schematic (fig. 5.3—5.5) cîte un exemplu de tehnici combinate publicate recent în literatura de specialitate pentru diferite categorii de ape : reziduale şi de suprafaţă (Leloup şi colab., 1979), de mare (Bernadez şi colab., 1977) şi potabilă (Gerba şi colab., 1978).

Sattar şi Westwood (1977) au utilizat următoarea combinaţie de metode de concentrare pentru apele reziduale : probele de apă aduse în pungi de plastic erau alcalinizate pînă la pH 7,2 apoi se reducea volumul probei prin centrifugare. La supernatant se adăuga ser de viţel pentru mărirea filtrabilităţii, se trecea prin filtrele de membrană (cu porii de 0,22 μm) pentru înlăturarea microbilor şi algelor şi se încerca izolarea enterovirusurilor.

Detectarea virusurilor în diferite categorii de apă, prin tehnica filtrării printr-un strat de talc (1,25 g) şi celit (0,40 g) presate între 2 foi de hîrtie de filtru Whatman, a fost aplicată de Sattar şi Ramia (1979).

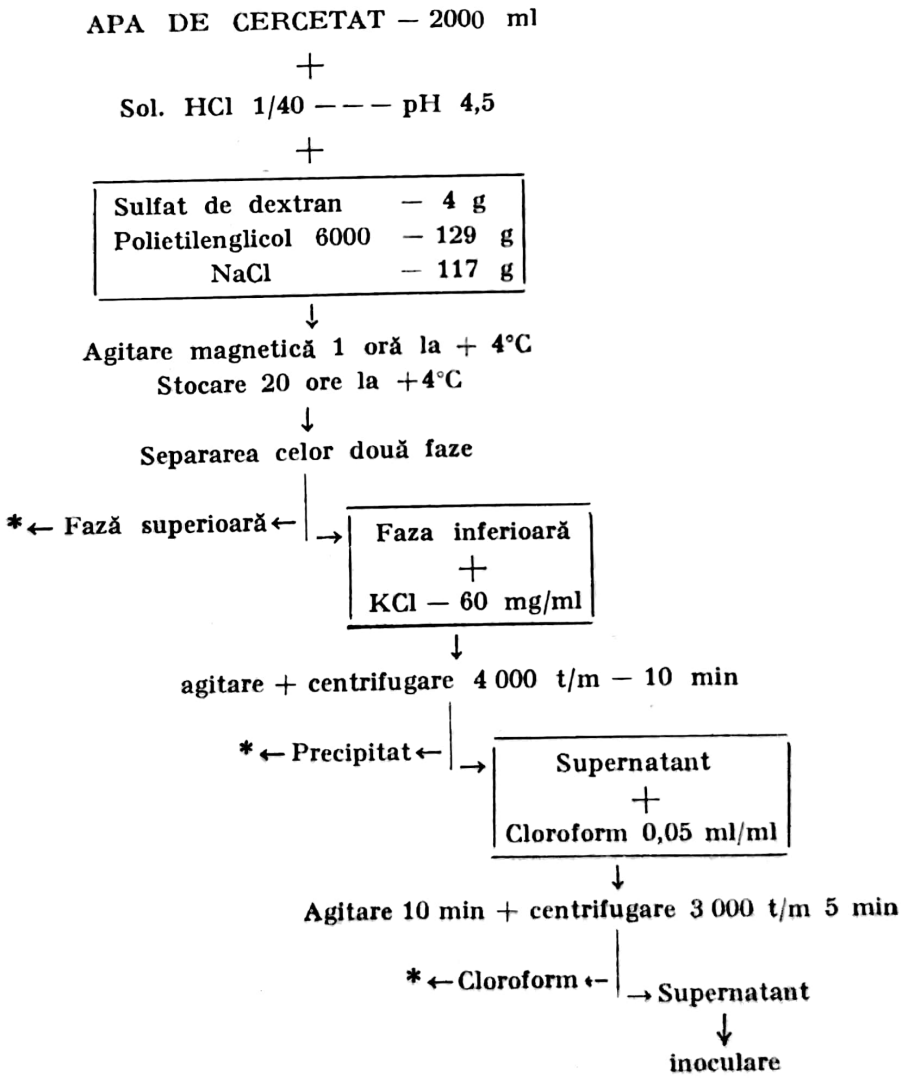


Fig. 5.3. — Tehnica de concentrare a enterovirusurilor din apele de suprafaţă sau de canal, folosită de Leloup şi colab. (1979) (* = se îndepărtează).

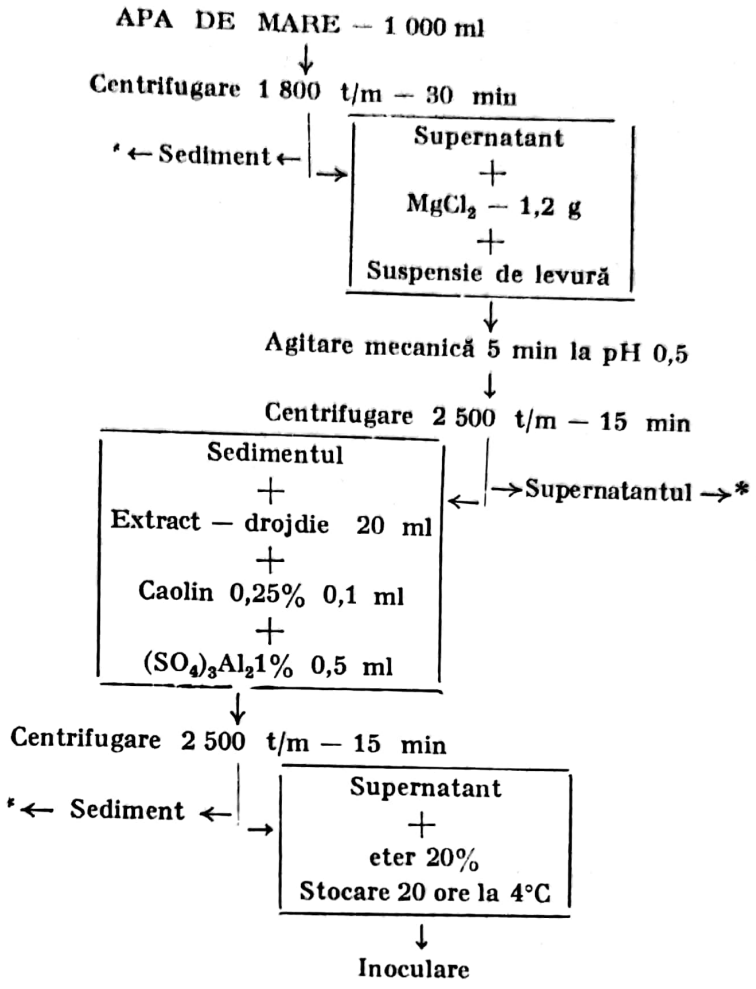


Fig. 5.4. — Tehnica de concentrare a enterovirusurilor din apa de mare, folosită de Bernandez şi colab. (1977) (* = se îndepărtează).

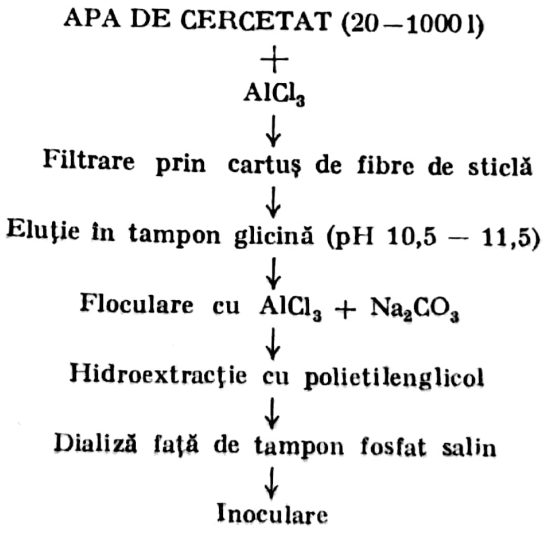


Fig. 5.5. — Tehnica de concentrare a enterovirusurilor din apa potabilă şi alte categorii de apă, folosită de Gerba şi colab. (1978)

Scanned with OKEN Scanner

După adsorbţia pe acest filtru şi eluţia cu ser fetal de viţel la pH 9, metoda a fost combinată cu dializă cu polietilenglicol 6 000.

Avînd în vedere multitudinea metodelor propuse pentru concentrarea enterovirusurilor în apă, numeroşi cercetători au efectuat investigaţii pentru compararea eficienţei unora dintre acestea în raport cu tipul antigenic de enterovirus (Fattal şi colab., 1974; Fattal şi colab., 1977; Sekla şi colab., 1980). De exemplu, Fattal şi colab. (1974, 1977) comparînd mai multe metode au arătat că pentru virusul ECHO 7 cele mai favorabile s-au dovedit filtrele cu alginat de aluminiu şi metoda de separare bifazică (eficienţă pînă la 100%). Metodele cu membrane de nitroceluloză şi hidroxid de aluminiu permiteau izolarea de virusuri numai în proporţiile de 22% şi, respectiv, 54%. Totuşi, ele sînt preferabile pentru ape curate în probe pînă la 100 de litri. Pentru ape poluate este mai indicată metoda cu alginat de aluminiu şi cea cu hidroxid de aluminiu folosind un volum mai redus de probă (pînă la 10 litri).

d) *Metode de cercetare a sedimentelor şi nămolurilor.* Deoarece în unele condiţii sedimentele şi nămolurile pot să conţină o cantitate mai mare de virusuri decît apa respectivă, s-a impus punerea la punct a unor metode în acest scop.

Virusurile pot fi eluate direct de pe probele de sediment sau nămol cu ajutorul tamponului de glicină (pH 7,5—9,0) sau cu extract de carne de vită sau cu alţi eluenţi organici similari. Precipitarea sau flocularea la un pH slab, folosindu-se alaun sau clorură ferică, urmată de eluţie oferă cele mai bune rezultate în cazul probelor cu virusuri puţine (Berg şi Dahling, 1980). Eluţia la un pH ridicat nu este recomandată dacă nămolurile conţin amoniu (NH_4^+) deoarece acesta se transformă în amoniac (NH_3) care distruge virusurile. În figura 5.6 este redată, ca exemplu, schema

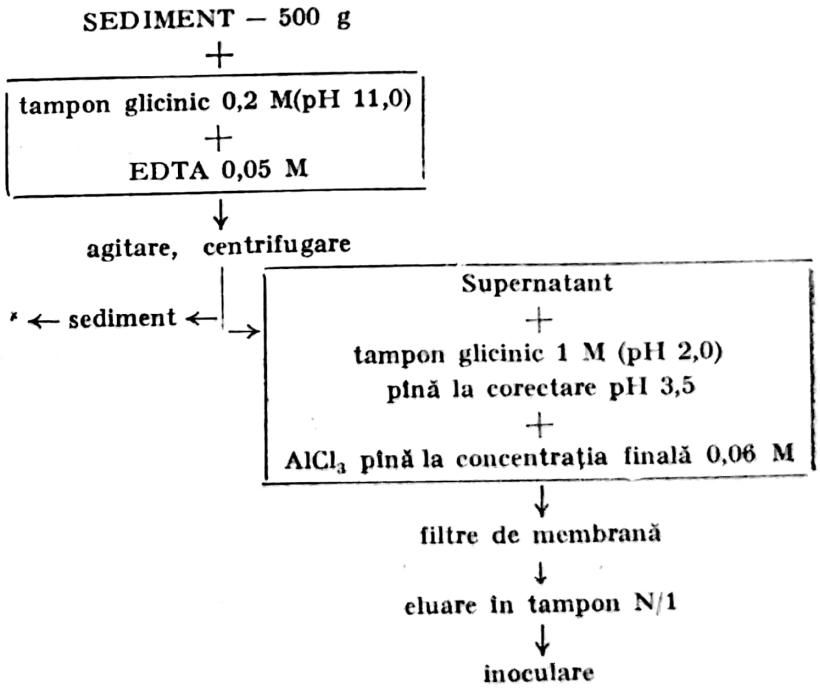


Fig. 5.6. — Tehnica de concentrare a enterovirusurilor din sedimentul apei de rîu, folosită de Gerba şi colab. (1977c) (* = se îndepărtează).

unei metode de concentrare a enterovirusurilor utilizată de Gerba şi colab. (1977 b) pentru sedimente. Pentru izolarea enterovirusurilor din sedimente a mai fost propusă metoda cu urce-lizină (Farrah şi colab., 1981), metoda cu ultrasunete urmată de eluţia virusului cu extract de carne (Koch, 1981).

Pentru detectarea enterovirusurilor din nămolurile apelor reziduale în instalaţiile de epurare, Hurst şi colab. (1978) au obţinut concentrarea virusurilor ECHO 7 şi Coxsackie B3 aplicînd flocularea cu $Al(OH)_3$, eluarea cu tampon glicină şi trecerea prin filtre de membrană. Alte metode avînd acelaşi scop au fost cele propuse de Turk şi colab., (1980) care au folosit eluţia în apă distilată şi concentrarea cu bentonită ş.a.

Nielsen şi Lydholm (1980) au studiat eficienţa a patru metode de izolare a enterovirusurilor din sedimentele apelor reziduale: (I) eluare cu ajutorul extractului de carne; (II) precipitare acidă urmată de eluţie cu extract de carne, (III) precipitare cu sulfat de aluminiu urmată de eluţie în tampon Tris şi (IV) inoculare directă. Cea mai mare eficienţă a izolării virusurilor din sedimente s-a obţinut prin metodele II şi III.

Pancorbo şi colab. (1981) au evidenţiat influenţa tipului de nămol (prelucrat pe cale aerobă sau anaerobă) asupra izolării enterovirusurilor din sediment.

e) *Evaluarea cantitativă a gradului de poluare virală.* În stadiul actual nu există încă metode uşor aplicabile pentru evaluarea cantitativă a gradului de poluare enterovirală a apei, similare celor pentru poluarea microbiană.

În anul 1976, Zotova şi Mîsleaeva au utilizat în acest scop pentru concentrare adsorbţia pe răşina AB—17 şi pentru izolare metoda plajelor, luînd ca indicator poliovirusul. Numărul plajelor pe 1 ml s-a recalculat pe volumul total al apei de cercetat. Capacitatea de adsorbţie a răşinii s-a determinat plecînd de la următoarea proporţie: A—100%, B—X% (A = concentraţia iniţială a virusului la 1 litru; B = titrul virusului din 10 ml eluat; X = procentul de adsorbţie a răşinii testate). Datele obţinute au arătat că, efectuînd concentrarea virusului pe ionit, nu s-a obţinut adsorbţia completă a virusului. Autorii au exprimat gradul de ineficienţă prin calculul coeficientului $K = \frac{A}{B}$.

Metode cantitative au fost propuse şi de alţi cercetători ca Sarrette şi colab. (1977, 1978) şi Kazanţeva şi colab. (1978 b). Recent, Aizen (1982) a propus o metodă de determinare cantitativă a enterovirusurilor din apă prin inocularea probei pe culturi celulare în monostrat în eprubete, ceea ce permite aplicarea ei în laboratoare mai puţin dotate.

Recapitulînd datele privind posibilităţile de concentrare a virusurilor, prin metode atît de numeroase şi variate, se constată că eficienţa acestora este foarte diferită, raportul dintre volumul iniţial al probei de apă şi cel final al concentratului variind între 1 : 10 şi 1 : 10 000. Astfel, metodele cu răşini schimbătoare de ioni permit concentrări de 10—50 de ori pe cînd adsorbţia pe membrane filtrante, pe săruri de aluminiu, separarea bifazică sau metoda de adsorbţie pe levură pot asigura reducerea volumului iniţial pînă la 10 000 ori. În plus, trebuie să se ţină seama de faptul că gradul de eficienţă a metodelor de concentrare a fost evaluat pe baza contaminării artificiale a probelor de apă cu anumite tipuri serologice de enterovirusuri şi nu se poate face, desigur, o extrapolare riguroasă pentru probele din teren şi nici pentru toate tipurile antigenice de enterovirusuri, cunoscute fiind diferenţele dintre ele. La aceasta se adaugă lipsa unor metode standardizate.

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul 5.3 sînt redate după experţii O.M.S. (1979) metodele de elecţie pentru concentrarea virusurilor în diferite categorii de apă.

5.1.2.3. **Metode de izolare.** Odată concentrate, probele de apă urmează a fi tratate cu antibiotice şi inoculate unor gazde de laborator specifice

Tabelul 5.3

Metode de cercetare a virusurilor în diferite categorii de ape şi nămoluri
(după O.M.S., 1979)

METODA	TIPUL DE PROBĂ
Inocularea directă fără concentrare	Ape uzate, nămoluri
Prelevare cu tampoane	Probe de ape uzate (metodă sensibilă, însă nu este cantitativă)
— Adsorbţie pe filtre/eluţie — Adsorbţie şi precipitare cu ajutorul sărurilor cationice polivalente — Utilizarea aluminiului preformat, a hidroxidului de aluminiu, a oxidului feric, a clorurii ferice sau a flocoanelor de calciu — Floculaţie prin adăugarea de săruri — Hidroextracţie şi tehnicile de separare în două faze apoase prin adăugarea de polimere — Alginat solubil — Precipitare la un pH slab	Probe de apă 0,2 — 5,0 l presupuse a avea mai mult de o unitate infecţioasă de virus pe 1 litru
— Membrane plate, filtre criblate — Adsorbţie pe filtre în flux continuu a probelor acidulate, urmată de eluţie cu un pH crescut — Tratare simplă sau tratare multiplă	Probe voluminoase de 5—400 de litri sau mai mari. În general se poate folosi o tratare simplă pentru probele pînă la 200 litri, adică, pentru probele conţinînd cantităţi relativ mari de virusuri cum ar fi cazul apelor uzate, efluenţilor trataţi şi apelor de suprafaţă poluate
— Filtrare prin filtre plisate urmată de eluţie — Floculaţie organică urmată de eluţie — Filtrare prin fibre adsorbante cu sarcină pozitivă urmată de eluţie — Adsorbţie pe praf de sticlă urmată de eluţie	Ape subterane, ape de suprafaţă mai slab poluate şi ape uzate tratate puternic (tratare multiplă)

enterovirusurilor : culturile celulare şi şoarecele sugar. Tehnicile de inoculare, de izolare şi de identificare nu diferă de cele aplicate pentru orice produs patologic examinat în acelaşi scop.

În cazul probelor de apă se fac totuşi unele precizări şi recomandări. Astfel, sînt posibile unele erori de interpretare a efectului citopatogen datorită unor substanţe utilizate pentru concentrare şi care sînt, uneori, toxice pentru culturi celulare (ex. sulfatul de dextran). Nu este de neglijat nici faptul că, în cazul coexistenţei mai multor virusuri pe acelaşi suport celular,

Scanned with OKEN Scanner

pot să apară fenomene de interferență : unele virusuri se dezvoltă rapid (de ex. virusul polio) putînd masca multiplicarea altor virusuri care se dezvoltă mai lent (virusul ECHO).

După Martins și colab. (1982), celulele de origine simiană (MK2, BS—C—1) au prezentat o sensibilitate superioară celor de origine umană, în timp ce Irving și Smith (1981) au înregistrat rezultate mai bune pe linia celulară HeLa-R, iar Morris și Waite (1980) pe celule BGM. După acești din urmă autori, culturile celulare în monostrat pe eprubete au dat o proporție mai mare de izolări în comparație cu culturile celulare în monostrat pe flacoane. Metoda plajelor este considerată de elecție.

Konowalchuk și Speirs (1973) au arătat că sensibilitatea culturilor celulare se mărește dacă virusurile sînt inoculate pe celule în suspensie și agitate apoi 1—2 ore pentru a favoriza contactul.

În prezent, investigațiile avînd ca scop elaborarea unor metode eficiente de izolare și identificare a enterovirusurilor din ape, în vederea cunoașterii potențialului infecțios al acestora, sînt în plină desfășurare în toate laboratoarele de profil din lumea întreagă înregistrîndu-se progrese care vor duce cu siguranță la realizarea unor metode cu eficiență optimă. Punerea la punct a unor asemenea metode va asigura organelor sanitare posibilitatea supravegherii virusologice a apei de băut, a apelor de suprafață folosite în variate scopuri de colectivități umane și a apelor fecalo-menajere netratate și tratate.

5.1.3. PREZENȚA ENTEROVIRUSURILOR NEPOLIOMIELITICE ÎN DIFERITE CATEGORII DE APĂ

Frecvența cu care enterovirusurile pot fi puse în evidență în apă depinde, în primul rînd, de categoria acesteia, adică dacă este vorba de apă reziduală, ape de suprafață (rîuri, lacuri, mări), apă freatică sau apă potabilă. La aceasta se adaugă o serie de factori ca pH, temperatură, lumină, salinitate, plancton, serotipul de virus și mai ales concentrația sa inițială din apă, virusurile nefiind capabile de a se multiplica în mediul extern.

5.1.3.1. **Ape reziduale.** *Frecvența enterovirusurilor în apa de canal.* Prezența enterovirusurilor în apele de canal a fost pusă în evidență de numeroși cercetători în cele mai diferite zone ale lumii, proporția probelor pozitive variind de la 0,5 și pînă la 100% din totalul celor cercetate (Grinstein și colab., 1970 ; Hartemann și colab., 1981 ; Irving și Smith, 1981). Enterovirusurile au fost găsite, așa cum vom arăta în continuare (cap. 5.1.5), atît în apa de canal brută cît și în cea care a fost supusă unui tratament în stații de epurare.

În țara noastră, primele cercetări privind prezența enterovirusurilor în apele reziduale aparțin lui Nestor (1964, 1967a) de la Cluj care inițial a efectuat investigații numai pentru evidențierea virusurilor Coxsackie prin inocularea probelor pe șoarece nou-născut. În perioada 1969—1971, Nestor și Costin (1976) au izolat virusul Coxsackie într-o proporție de 29,11% din totalul probelor de apă de canal prelevate prin metoda tampoanelor și concentrate în paralel prin trei procedee. În zona Moldovei, Zavate și colab. (1980) și Cotor și colab. (1981) au izolat enterovirusuri în proporții de 54,2 și respectiv 50,3% dintre probele de canal provenite din colectivități infantile.

În ceea ce privește cantitatea de virus din apa reziduală s-a stabilit că printr-un gram de materii fecale se pot elimina 1 milion de particule

Scanned with OKEN Scanner

virale, iar într-un litru din unele ape menajere s-au găsit 7 000 pînă la 500 000 de particule virale (Melnick și colab., 1978). Cantitatea de virusuri în apa reziduală depinde de o serie de factori ca : serotipul de enterovirus, sezonul, nivelul socioeconomic, densitatea și morbiditatea populației de la care provine apa de canal respectivă etc.

În general, tipurile antigenice de enterovirusuri din apele reziduale ca și cele din masa populației variază de la un an la altul, predominanța virusurilor Coxsackie semnalată de unii autori (care au efectuat inoculări atît pe culturi celulare cît și pe șoarecele nou-născut) datorîndu-se, după Charbonneau (1978), tehnicilor de laborator care favorizează în oarecare măsură izolarea acestui grup în comparație cu virusurile ECHO.

Majoritatea autorilor (Melnick și colab., 1978; Nestor, 1967a; Cotor și colab., 1981) au semnalat o incidență sezonieră netă a izolărilor de enterovirusuri nepoliomielitice, lunile cu proporțiile maxime fiind cele de vară și începutul toamnei, care corespund sezonalității cunoscute în morbiditatea prin enteroviroze. Există și autori care nu au putut evidenția sezonalitatea izolărilor de enterovirusuri în apele de canal și în cele de suprafață (Leloup și colab., 1979), concentrația virusurilor fiind relativ stabilă de-a lungul anului. S-au constatat variații importante ale cantității de enterovirusuri din apa de canal în decursul a 24 de ore (Fattal și Nishimi, 1977). După Grinstein și colab. (1970), în decurs de 24 de ore concentrația enterovirusurilor poate varia între 304 000 și 6 014 000 UFP/l.

În ceea ce privește incidența izolărilor în raport cu provenienta apei, proporțiile înregistrate în apele reziduale recoltate din guri de canal apropiate de colectivitățile umane sînt în general mai crescute decît cele din canalul colector al unei localități în care se devarsă cel mai adesea și ape industriale, avînd unele efecte virulicide.

Cercetarea apelor de canal în vederea supravegherii circulației enterovirusurilor în masa populației. În stadiul actual, supravegherea sistematică a circulației enterovirusurilor este un deziderat pentru majoritatea serviciilor de sănătate publică. Această supraveghere este posibilă fie prin examinarea materiilor fecale provenite din masa populației infantile aparent sănătoase (metodă care nu permite un studiu larg datorită dificultății tehnicilor de lucru), fie prin examinarea apelor reziduale, izolarea de enterovirusuri reflectînd gradul sau frecvența purtătorilor din mase mai largi de populație.

S-a pus problema dacă tipurile antigenice de enterovirusuri din apa de canal reflectă în mod real circulația lor în masa populației. Din acest punct de vedere, rezultatele diferiților cercetători care au efectuat investigații virusologice asupra prezenței enterovirusurilor în fecalele unui număr reprezentativ de persoane în special de copii și, comparativ, în apa de canal provenită de la grupul de populație respectiv au fost contradictorii.

De exemplu, Drozdov și Kazanțeva (1977) au cercetat din punct de vedere virusologic apele reziduale dintr-o stație centrală a unei localități de tip urban cu 20 000 locuitori, apele din colectoarele unor colectivități de copii și, comparativ, din fecalele copiilor care frecventau aceste colectivități, constatînd o concordanță relativ satisfăcătoare între serotipurile izolate din apă și din materiile fecale. Totuși, în materiile fecale ale copiilor s-au mai găsit încă alte 7 tipuri de enterovirusuri care lipseau din apa de canal. Într-o investigație virusologică efectuată în perioada 1969—1972

Scanned with OKEN Scanner

printre copiii din 43 de creşe şi, în paralel, în canalele colectoare ale instituţiilor respective, Zdrazilek şi colab. (1974) au constatat o concordanţă mai satisfăcătoare a tipurilor antigenice în comparaţie cu situaţia găsită în canalele magistrale ale oraşului. Comparînd tipurile antigenice izolate din fecalele bolnavilor cu cele din apele reziduale ale oraşului Reding, Sellwood şi colab. (1981) au constatat, la rîndul lor, o concordanţă satisfăcătoare şi acelaşi aspect sezonier. La rezultate similare au ajuns şi alţi cercetători (Hermann şi Koehn, 1981).

În ţara noastră, Zavate şi colab. (1980) au comparat tipurile antigenice de enterovirusuri din apa de canal, de pe obiecte şi din materiile fecale a copiilor dintr-o colectivitate (tabelul 5.4). Tipurile antigenice de virus polio 1, ECHO 1, Coxsackie B1 şi A9 au fost puse în evidenţă în toate cele trei categorii de probe, în timp ce virusurile ECHO tip 7, Coxsackie B4 şi B5 au fost izolate numai din apă.

Tabelul 5.4

Compararea tipurilor antigenice de enterovirsuri izolate în fecale, pe obiecte şi în apa de canal (Zavate şi colab., 1980)

Tip antigenic	Număr de tulpini izolate			TOTAL
	Fecale	Obiecte	Apa de canal	
Poliovirus 1	6	3	2	11
ECHO 1	9	3	11	23
ECHO 2	—	—	1	1
ECHO 12	1	—	2	3
Coxsackie B1	8	5	9	22
Coxsackie B3	1	—	3	4
Coxsackie B4	—	1	—	1
Coxsackie B5	—	—	1	1
Coxsackie A9	1	1	4	6
Coxsackie A (netipizat)	10	3	6	19
TOTAL	36	16	39	91

Dimpotrivă, Charbonneau (1978) a arătat că în perioada 1974—1976 în Franţa proporţia probelor de apă de canal pozitive a variat între 40 şi 17% fără să se fi putut stabili o corelaţie netă între tipurile antigenice de enterovirusuri circulante şi cele prezente în apa de canal. Astfel, în timp ce în masa populaţiei infantile în anul 1974 şi 1975 a predominat virusul ECHO tip 30, în apele uzate au fost găsite mai frecvent virusurile Coxsackie B4 în 1974 şi B3 şi B5 în anul 1975.

Rezultatele contradictorii obţinute de diferiţi autori, variind între admiterea sau negarea totală a unei concordanţe dintre serotipurile circulante în masa populaţiei şi cele din apele reziduale, au putut fi explicate prin cercetările, puţine la număr, care au stabilit corelaţii cantitative dintre procentajul de eliminatori ai unui serotip şi apariţia serotipului respectiv în apa de canal. Pe bază de calcule matematice se consideră că pentru ca un tip de enterovirus să fie prezent în apele reziduale ar fi necesar ca cel puţin o proporţie de 6—10% din masa populaţiei să fie eliminatori fecali (Drozdov şi Kazanţeva, 1977 ; Kazanţeva şi Drozdov, 1977 ; Melnick

Scanned with OKEN Scanner

și colab., 1978), situație în care concordanța este bună iar rezultatele obținute prin examinarea apei de canal pot fi utilizate pentru aprecierea circulației enterovirusurilor în masa populației.

5.1.3.2. **Ape de suprafață.** Apele de suprafață, reprezentate de rîuri, lacuri, mări sau oceane pot fi contaminate cu enterovirusuri prin ape de șiroire dar, în special, prin apele reziduale care sînt deversate de regulă în apele de suprafață și care, deși tratate, mai conțin virusuri patogene pentru om, provenite din materiile fecale ale bolnavilor sau purtătorilor. Bagdasarian și colab. (1982) au arătat că enterovirusurile se pot deplasa pe cursul rîurilor în aval pe distanțe apreciabile, de peste 300 km, procesele de autoepurare față de poluarea virală fiind mai puțin eficiente în comparație cu poluarea bacteriană.

Rîuri și lacuri. Cercetători din multe țări au pus în evidență în apele rîurilor și lacurilor enterovirusuri în proporții variind între 3 și 70% din totalul probelor investigate (Feachem și colab., 1981; Walter și colab., 1982).

În R. D. Germană, Valter-Offenhauer și Horn (1974) au efectuat investigații virusologice privind prezența enterovirusurilor în 5 puncte de apă de suprafață dintre care două din rîu în zona din oraș și în afară, două din lacuri fără scurgere folosite pentru scăldat și unul dintr-un lac cu apă curgătoare. Enterovirusurile au fost puse în evidență în 30% din cele 247 probe de apă cercetate.

În Franța, Foliguet și colab. (1978) au arătat că enterovirusurile au fost prezente în mai multe rîuri care servesc ca sursă de apă potabilă (Rin, Sena, Marna și Mosela) în concentrații atingînd 300 UFP/l. Leloup și colab. (1979), la rîndul lor, inoculînd pe culturi celulare 163 de probe de apă de suprafață recoltate în regiunea Rhône-Alpes din zona centrului nuclear din Bugey au izolat 6 (3,6%) tulpini de enterovirusuri, proporții relativ reduse în comparație cu cele relatate de alți cercetători.

În anul 1981, Kazanțeva și colab. au publicat un studiu privind prezența de enterovirusuri în apele bazinelor hidrografice din R. D. Germană și U.R.S.S. Incidența izolărilor în apele de rîu din U.R.S.S. a fost de 36% iar în apele din lacuri de 32% în R. D. Germană și de 9% în U.R.S.S.

Într-un studiu de sinteză privind contaminarea enterovirală a apelor de suprafață din R.D. Germană în perioada 1970—1979, publicat de către Walter și colab. (1982), s-a arătat că incidența izolărilor a fost în medie de 20% din totalul probelor cercetate, cu variații între 8 și 92%. Au fost înregistrate diferențe în procentajul izolărilor și al tipurilor antigenice de la un an la altul.

Pentru prima dată în țara noastră, Nestor (1964, 1967 a), ca urmare a inocularilor de probe de apă pe șoarecele nou-născut, a izolat din rîul Someș în perioada 1963—1964 22 de tulpini de virusuri Coxsackie. În continuarea investigațiilor, cercetătorii din Institutul de igienă și sănătate publică din Cluj-Napoca au studiat prezența enterovirusurilor în apa și nămolul fluviului Dunărea (Nestor și colab., 1978a). Într-o sinteză publicată în anul 1981 (Nestor și colab.), s-a arătat că din 401 probe recoltate din fluviu de la intrarea în țară și pînă la vărsare (din care 205 de apă și 196 de nămol) enterovirusurile au fost izolate în medie în 15,7% din probe (cu variații între 4,4 și 41,6%). Incidența izolărilor din sediment a fost similară cu cea din apă. S-a constatat tendința de scădere a poluării enterovirale în deltă în comparație cu celelalte sectoare ale acestui fluviu. Din totalul tulpinilor de

enterovirusuri izolate în perioada menţionată 61,6% aparţineau grupurilor de virusuri Coxsackie şi ECHO şi 38,33% virusurilor polio.

În Moldova, Cotor şi colab. (1981) au înregistrat o incidenţă de 14,2% izolări din 148 probe de ape din rîuri (Prut = 18,5%, Siret = 13,3%, Dunăre = 9,5%). Din 20 de probe de apă de lacuri, 9(45,0%) au fost pozitive pentru enterovirusuri. Dintre virusurile izolate în rîuri, 35,3% au fost reprezentate de Coxsackie subgrup A, 41,2% Coxsackie subgrup B şi 23,5% ECHO.

Prezenţa enterovirusurilor în lacurile de acumulare din zona Transilvaniei a fost cercetată de Nestor şi colab. (1981 a) care au constatat că acestea sînt mai puţin impurificate (10,0 — 13,8%) în comparaţie cu rîurile din aval de lacuri, situaţie favorabilă dat fiind utilizarea apei lacurilor în scop potabil.

Ştrandurile plasate pe cursul rîurilor sau bazinele artificiale de înot prezintă, la rîndul lor, un risc ridicat de contaminare cu enterovirusuri ţinînd seama că ele sînt frecventate de un număr mare de persoane — de exemplu în Ungaria de aproximativ 1 milion de persoane (Somosi, 1981) — fiind lipsite totodată de procesele naturale de autoepurare biologică.

În ceea ce priveşte riscul de contaminare, pe lîngă contactul pielii şi mucoaselor cu apa poluată persoanele care se scaldă sînt expuse şi la o contaminare digestivă, considerîndu-se că la un scăldat o persoană ingeră cel puţin 10 ml de apă.

Incidenţa izolărilor de enterovirusuri în apele de ştrand a variat între 16 şi 71% (Liebscher, 1970; Keswick şi colab., 1981). În ţara noastră, Cotor şi colab. (1983) au pus în evidenţă enterovirusuri în 28,4% din probele apei din ştrandul „I" constatînd o corelaţie directă între gradul de poluare virală şi vechimea apei (fig. 5.7), ceea ce impune respectarea normelor privind curăţirea şi dezinfecţia bazinelor şi periodicitatea schimbării apei (Keswick şi colab., 1981; Jessen şi Cottschalt, 1982).

Apele marine. Sursele de poluare a apelor marine provin în principal din vărsarea apelor de canal netratate sau insuficient epurate direct în mare. O sursă mai puţin importantă o constituie navele.

Numeroşi autori au semnalat prezenţa de enterovirusuri în apele mării în proporţii care au variat între 10 şi 100% din probe (Gerba şi colab., 1979; Hugues şi colab., 1981). Numărul virusurilor a oscilat între 5 şi 126 de UFP/10 l apă (Steinmann, 1977; Bondarenko şi Popovici, 1982).

Izolările de enterovirusuri au fost mai frecvente în apropierea deversoarelor de ape reziduale. Totuşi, numeroase observaţii au arătat că, spre deosebire de bacterii, virusurile au putut fi găsite la distanţe mari de locul de deversare a apelor reziduale (70—140 m şi chiar 385 m) şi, totodată, la adîncimi mari (12 m). Se evidenţiază acţiunea favorizantă a vînturilor şi valurilor asupra diseminării enterovirusurilor în apa de mare (Steinmann, 1977; Nestor şi colab., 1977; Hugues şi colab., 1979a; Hugues şi colab., 1981).

Sedimentele marine pot să constituie, la rîndul lor, depozite importante de enterovirusuri din care, prin mişcarea valurilor, prin curenţii de fund în locurile cu apă puţină şi prin circulaţia ambarcaţiunilor, virusurile se pot reîntoarce în apa marină constituind pericol pentru persoanele care se scaldă (Smith şi colab., 1978).

Investigaţiile care au avut ca scop evaluarea contaminării virale şi bacteriene a sedimentelor în comparaţie cu apa de mare au arătat că în sediment incidenţa izolărilor de enterovirusuri a fost mai mare iar

Scanned with OKEN Scanner

concentrația acestora de 10—10 000 ori mai crescută în comparație cu apa de mare din același loc de recoltare. În unele cazuri enterovirusurile au fost puse în evidență numai în sediment iar apa de mare a fost lipsită de virusuri și totodată corespunzătoare din punct de vedere bacteriologic. Se consideră că 90—95% din virusurile din apă sînt adsorbite pe parti-

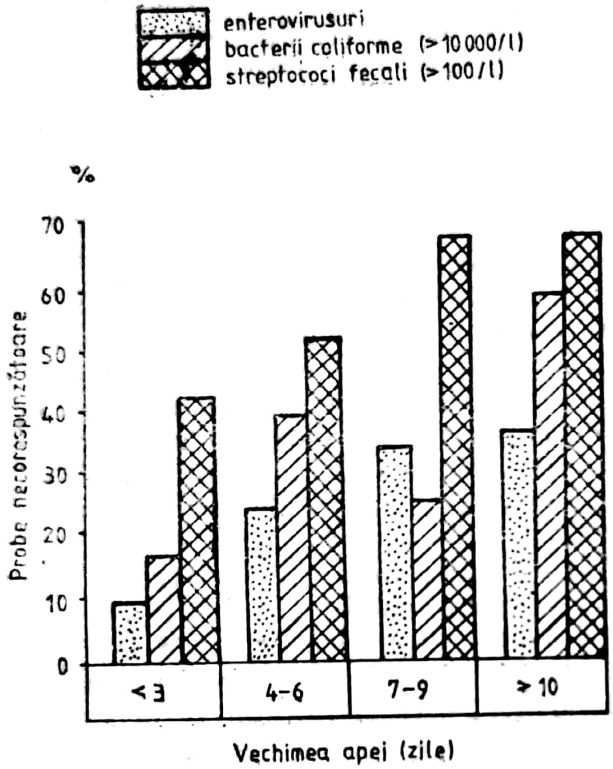


Fig. 5.7. — Gradul de poluare fecală în raport cu vechimea apei din bazinele ștrandului (după Cotor și colab., 1983).

culele în suspensie și se depun în sedimente (Petrilli și De Flora, 1977; Melnick și colab., 1978; La Belle și colab., 1980; Kapucinski și Mitchell, 1980).

Prezența enterovirusurilor în apa de mare și în sedimente constituie totodată o sursă de contaminare pentru diferitele organisme marine destinate consumului alimentar (stridii, midii etc.). Detalii privind acest aspect sînt prezentate în capitolul 5.3. La pești, încercările de contaminare cu virusuri umane au dus la rezultate negative iar virusurile peștilor, deși se aseamănă cu cei umani, nu au putut fi transmise la om. În plus, așa cum vom arăta în continuare (5.1.4.) o serie de cercetări evidențiază acțiunea inactivantă a apei de mare asupra enterovirusurilor.

5.1.3.3. **Apa potabilă.** *Frecvența izolărilor.* Evidențierea enterovirusurilor în apa potabilă a fost posibilă relativ mai recent, odată cu punerea la punct a unor metode eficiente de concentrare a virusurilor din volume foarte mari de apă. După ce în 1960 enterovirusurile au fost detectate în 18% din cele 200 de probe de apă potabilă de conductă din Paris, cercetători din alte țări ca S.U.A. (Melnick și Gerba, 1980), R. D. Germană (Walter și Rüdiger, 1977), Canada (Sekla și colab., 1980), Israel (Marzouk și colab., 1980) și Franța (Payment, 1981) au semnalat prezența enterovirusurilor în apa potabilă, chiar în cea clorinată prin metode uzuale, ceea ce demonstrează că ele supraviețuiesc acestui tratament.

În R. D. Germană, Walter și Rüdiger (1977) au arătat că în 13% din cele 62 probe cercetate s-au identificat diferite serotipuri de enterovi-

rusuri. Titrul scăzut al virusurilor nu impune, după aceşti autori, vreo măsură suplimentară de dezinfecţie dar apare clar necesitatea introducerii controlului virusologic la toate sursele de apă potabilă mai importante. Dimpotrivă, alţi autori (Cookson, 1974) consideră că, în concentraţii reduse, virusurile din apă provoacă de regulă afecţiuni asimptomatice persoanele afectate excretînd virusurile şi infectînd contacţii din jur.

Din punct de vedere cantitativ, Payment (1981) a arătat că în majoritatea probelor pozitive enterovirusurile au fost prezente în proporţie de 1—10 UFP/100 l apă, ceea ce prezintă un real pericol dacă ţinem seama că 1 unitate infectantă poate determina boala la om.

După experţii O.M.S. (1979), dacă în apa de reţea se asigură o cantitate de 0,3—0,5 mg/l clor rezidual liber, după 30-60 minute de contact apa destinată consumului populaţiei este lipsită de virusuri.

Enterovirusurile au mai fost puse în evidenţă şi în apa potabilă de fîntînă în proporţii variind între 2,8 şi 5,0 % din probe, ceea ce dovedeşte că în anumite condiţii ele pot fi transportate în stratul freatic de apă fără a fi inactivate. Într-adevăr, Wellings şi colab. (1975) şi Vaughn şi colab. (1978) au demonstrat migrarea laterală şi verticală a enterovirusurilor în sol, spre apele freatice, pe distanţe relativ mari în special în perioada ploilor abundente. În Israel, Marzouk şi colab. (1980) au examinat 99 probe de apă freatică, 20 % dintre acestea fiind pozitive pentru enterovirusuri.

În ţara noastră, Nestor şi colab. (1978 b) au examinat, în cursul anilor 1972—1976, 220 de probe din sistemul de aprovizionare centrală cu apă, prelevate în opt centre urbane. Enterovirusurile au fost depistate în apa potabilă din patru oraşe proporţia probelor pozitive fiind în medie de 3,64 %. S-au izolat trei tulpini de poliovirus tip 3 atenuat, două tulpini de virus Coxsackie A4 şi şase tulpini netipizabile. Nu s-a pus în evidenţă corelaţia dintre prezenţa virusurilor şi morbiditatea din oraşele respective.

Corelaţia dintre unii indicatori de poluare a apelor şi prezenţa enterovirusurilor. Întrucît este cunoscut că enterovirusurile sînt mai rezistente decît bacteriile la procesul de tratare a apelor, se consideră că determinarea parametrilor bacteriologici obişnuiţi nu poate constitui un indicator valabil pentru poluarea virală. Într-adevăr, autorii care au urmărit rezultatele virusologice ale apelor şi indicele coli nu au putut demonstra o corelaţie dintre valorile înregistrate. Astfel, Valter-Offenhauer şi Horn (1974) au arătat că, în 32 % dintre probele de apă în care s-au izolat virusuri, indicele coli a fost corespunzător. Gerba şi colab. (1979) au arătat că incidenţa izolărilor de enterovirusuri a fost aproape egală în apele cu indicele coli sub şi peste limitele admise (43 şi respectiv 44 %). Observaţii similare au fost raportate şi de alţi cercetători (Vaughn şi colab., 1979; Kazanţeva şi colab., 1981; Bagdasarian şi colab., 1982).

Dimpotrivă, alţi autori au constatat o oarecare relaţie dintre indicele coli şi incidenţa izolărilor de enterovirusuri din diferite categorii de apă, acestea fiind prezente în mod constant în ape cu indicatori bacteriologici ridicaţi, de peste 1 000 corpi bacterieni/100 ml (Nestor, 1980; Crovari şi colab., 1974; Watson, 1977). De exemplu, Crovari şi colab. (1974) au constatat că izolarea de enterovirusuri era posibilă doar în apele cu un conţinut de 100—1000 E.coli/100 ml. În S.U.A., Watson (1977) a arătat că din patru sectoare de apă de mare cu valori diferite de E. coli, determinate prin filtre de membrană, şi anume cu 21 000, 4 200, 2 600 şi 1 100 E. coli/100 ml, enterovirusurile au fost izolate numai în primele două zone, mai poluate. Petrilli şi De Flora (1977), examinînd 54 de probe de apă de

Scanned with OKEN Scanner

mare, au arătat că în 13 care prezentau sub 540 E. coli/100 ml apă nu a putut fi izolată nici o tulpină de virus, spre deosebire de celelalte 41 de probe cu valori de peste 920 E. coli/100 ml apă.

Au mai fost propuşi ca indicatori ai poluării fecale streptococii fecali (Dahling şi Safferman, 1979) sau colifagii. După Petrilli (1977) detectarea fagilor are avantajul rapidităţii şi uşurinţei procedeelor care se folosesc deja de zeci de ani. În comparaţie cu coliformii fecali, colifagii reprezintă un indicator mai bun al poluării enterovirale. Din păcate, variaţiile mari în durata de supravieţuire a bacteriofagilor din grupul coli nu permit stabilirea unui paralelism net faţă de enterovirusuri (Vaughn şi Metcalf, 1975). După experţii O.M.S. (1979) unele rezultate satisfăcătoare justifică continuarea cercetărilor în acest domeniu.

Alţi parametri chimici şi fizici ai apei, ca turbiditatea, oxidabilitatea, temperatura, radiaţia solară, prezenţa de amoniu şi magneziu etc. pot fi folosiţi doar ca indicatori adjuvanţi cu totul secundari (Valter-Offenhauer şi Horn, 1974; Kazanţeva şi colab., 1981; Walter şi colab., 1982).

În ţara noastră, Nestor (1979a) a urmărit relaţia dintre principalii indicatori ai calităţii apei potabile: numărul total de germeni crescuţi în agar la 37°C, numărul de coliformi, nivelul substanţelor organice şi nivelul de clor rezidual liber şi incidenţa izolărilor de enterovirusuri. Cu excepţia clorului rezidual, valoarea indicatorilor urmăriţi a fost în limite normale prevăzute de standardele de stat. În privinţa clorului rezidual, în majoritatea cazurilor valorile erau sub limitele recomandate deşi apa a fost tratată cu aproximativ 3—4 g clor gazos pe 1 m³. Întrucît cantitatea de substanţe organice a fost adesea crescută, se poate presupune că dozele de clor activ au fost suficiente doar pentru distrugerea coliformilor dar nu şi pentru inactivarea virusurilor.

În zonele în care poliovirusul circulă în masa populaţiei s-a propus ca acesta sau variantele guanidinorezistente ale acestuia să servească ca indicator de poluare virală a apei, rezistenţa sa fiind similară cu cea a majorităţii enterovirusurilor (Kazanţeva şi colab., 1980; Katzenelson şi Kedmi, 1979; Payment şi colab., 1979).

Desigur că în stadiul actual, cînd metodele de evidenţiere a enterovirusurilor nepoliomielitice în apă sînt din ce în ce mai perfecţionate, se tinde ca aprecierea calităţii apei — din punct de vedere virusologic — să se efectueze prin izolarea directă a enterovirusurilor din apa de cercetat, aceasta fiind singura modalitate de a obţine informaţii valabile asupra poluării virale a apei. Mai mult chiar, punerea în evidenţă a enterovirusurilor ar putea constitui ea însăşi un indicator de poluare pentru alte virusuri şi, în special, pentru virusul hepatitei virale pentru care nu există, încă, metode de detectare în apa de uz curent (Mayr, 1980; Melnick şi Gerba 1980). Rămîne de rezolvat problema unor dificultăţi de tehnică care limitează acest fel de analize la un număr restrîns de laboratoare, foarte specializate.

Propuneri de standardizare a prezenţei virusurilor în diferite categorii de apă. Avînd în vedere că poluarea apei nu poate fi împiedicată în totalitate, stabilirea de norme de calitate a apei presupune de regulă un risc calculat pe baza unei analize risc/avantaj şi cost/avantaj. Aceste norme ar trebui bineînţeles să reducă la minimum toate riscurile cunoscute pentru sănătate şi să fie periodic revizuite pe baza experienţei acumulate. În general, nu se poate vorbi de norme unice de calitate ci de norme pentru fiecare categorie de ape (reziduală, de suprafaţă, potabilă etc.), în funcţie de utilizarea acesteia pentru băut, scăldat, scop agricol, potabil etc.

Scanned with OKEN Scanner

În primă urgenţă apare necesară, desigur, stabilirea de standarde pentru poluarea virală a apei potabile, această problemă constituind o preocupare majoră pentru diferite colective de cercetători şi pentru O.M.S. care şi-a propus, totodată, să stabilească metodele de elecţie pentru determinarea concentraţiei virale în apă. În prezent puţine laboratoare dispun de dotare tehnică şi personal experimentat pentru efectuarea testelor respective.

Există şi păreri contrare în ceea ce priveşte necesitatea elaborării de standarde virusologice pentru apă. Astfel, Gamble (1979) arată că deşi O.M.S. a propus standarde virusologice severe, cu excepţia hepatitei şi gastroenteritelor virale severe, nu există dovezi sigure privind extinderea infecţiilor virale prin apa de băut tratată corespunzînd standardelor bacteriologice curente. După acest autor, absenţa unor informaţii sigure privind gradul de contaminare virusologică a apei de băut face ca introducerea standardelor virusologice să apară prematură.

În prezent se recomandă ca pentru apa potabilă să fie admisă cel mult 1 unitate virală la 100—1 000 de galoane iar pentru cea utilizată în scop recreativ 1 unitate virală la 10 galoane de apă (O.M.S., 1979; Melnick şi colab., 1978; Melnick şi Gerba, 1980; Morris şi Waite, 1981).

5.1.4. STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND SUPRAVIEŢUIREA ENTEROVIRUSURILOR NEPOLIOMIELITICE ÎN APĂ

Importanţa epidemiologică a prezenţei enterovirusurilor în apă poate fi apreciată mai bine prin studiile experimentale de laborator şi de teren privind durata de supravieţuire a acestora. Cercetătorii care au studiat comparativ durata de supravieţuire a enterovirusurilor în diferite categorii de apă au arătat că aceasta depinde de compoziţia chimică şi gradul de impurificare a apei, de temperatură, de rezistenţa individuală a tulpinii experimentate, de prezenţa unor microorganisme din apă etc. (Bagdasarian şi Abieva, 1971; Shaub şi colab., 1974; Lukina şi colab., 1981; Bagdasarian şi colab., 1980).

S-a constatat că în *apele reziduale* durata de supravieţuire a enterovirusurilor poate depăşi 100 de zile şi este cu atît mai mare cu cît gradul de impurificare este mai crescut, ceea ce se datorează cel mai probabil rolului protector al componentelor organice din apă. În ceea ce priveşte componentele chimice, Pojar (1975) a arătat experimental că apele reziduale alcaline sau acide, provenite de la un combinat de îmbogăţire a minereurilor, au o acţiune distrugătoare asupra enterovirusurilor care se manifestă în 6—7 zile pentru apele brute şi 11—21 de zile pentru cele diluate 1 : 50.

Shaub şi colab. (1974) au constatat că *apa de rîu* prezentînd o duritate ridicată şi avînd un conţinut ridicat de particule solide de argilă roşie a asigurat o adsorbţie foarte bună a virusurilor polio tip 1 şi Coxsackie B2. Apele din canalul maritim cu duritate totală ridicată şi cu un conţinut scăzut de Ca^{2+} au inhibat capacitatea de adsorbţie a virusului pe particule solide iar apa din bazin cu duritatea scăzută şi cu electroconductibilitate redusă a amplificat potenţialul de adsorbţie. Capacitatea de adsorbţie a virusurilor faţă de această argilă nu s-a realizat în apele marine.

În general, supravieţuirea enterovirusurilor a fost mai îndelungată la temperatură mai joasă (4—6°C) în comparaţie cu temperatura camerii (20—25°C). În apa rîului Tanana (Alaska), izolată complet sub un strat

Scanned with OKEN Scanner

de gheață, enterovirusurile au supraviețuit în condiții naturale peste 7 zile (Dahling și Safferman, 1979). Simkova și Wallnerova (1973) au arătat că virusul Coxsackie A4, chiar în cantități foarte reduse poate supraviețui în apa rîului Dunărea la temperatura de 4—8°C timp de 5 luni.

Inactivarea enterovirusurilor este inegală de-a lungul experimentelor. Astfel, scăderea maximă a titrului virusurilor, față de cel inițial, s-a înregistrat în primele 25—50 de zile din momentul instituirii experimentului. După acest interval, rămîne probabil populația virală cea mai rezistentă față de acțiunea factorilor defavorabili ai mediului extern și care condiționează durata generală a supraviețuirii virusului în experiment (Bagdasarian și Abieva, 1971).

Enterovirusurile pot supraviețui un timp îndelungat și în *apa de mare*. Totuși, o serie de cercetători au pus în evidență, experimental, proprietatea inactivantă a apei de mare asupra enterovirusurilor, natura acestui proces fiind și în prezent neelucidată. S-a stabilit că inactivarea necesită o concentrație minimă de 0,1 M NaCl. Apa de mare fiartă sau autoclavată pierdea doar o parte din proprietățile sale inactivante. În pofida numeroaselor experiențe, acțiunea inactivantă nu a putut fi atribuită numai salinității sau unor reacții de oxidare sau fotodinamice. Din plancton au fost extrase unele substanțe cu acțiune antimicrobiană antiseptică: acidul acrilic, hidrocarburi, aldehide. Temperatura joacă un rol important în inactivarea enterovirusurilor, scăderea titrului cu 3 log producîndu-se în 68 ore la 3—10°C și numai în 5 ore la 28—34°C (Denis, 1974; Pietri și Breittmayer, 1976; Bagdasarian și colab., 1980).

În ceea ce privește *apele subterane*, cităm experimentările lui Kokina și colab. (1977) care au folosit apa din trei puțuri diferite dintre care în primul apa nu conținea substanțe organice, în al doilea apa era îmbogățită cu humus din turbele îngropate și în cel de-al treilea apa prezenta semne de impurificare cu reziduuri menajere fiind situat la 140 m de cîmpurile de filtrare. Contaminarea s-a făcut cu virusurile polio tip 1, ECHO tip 7 și Coxsackie B3, cu fagul T_1 E.coli și cu o serie de bacterii. Rezultatele obținute pentru virusuri sînt redate în tabelul 5.5. Autorii

Tabelul 5.5

Durata de supraviețuire (în zile) a enterovirusurilor în apa a trei puțuri cu diferite compoziții chimice la 10 și 20°C (Kokina și colab., 1977)

Virus	Puțul I		Puțul II		Puțul III	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
Poliovirus	48	13	60	26	60	22
Coxsackie B3	82	45	105	62	103	58
ECHO 7	90	50	113	66	112	64
Fag T_1 E. coli	118	72	320	220	307	145

au constatat că scăderea titrului virusurilor a fost mai rapidă în primele 6—10 zile (0,5—1,5 log DCP_{50}/1 ml) și mai lentă în continuare (0,3—1,0 log DCP_{50}/1 ml). Supraviețuirea a fost mai îndelungată în apele puțurilor II și III care conțineau substanțe organice și în probele păstrate la 10°C în comparație cu cele de la 20°C. Virusul ECHO s-a dovedit mai rezistent decît Coxsackie sau poliovirusul și toate în ansamblu mai rezistente decît

Scanned with OKEN Scanner

bacteriile utilizate în experimentare (Sh. sonnei, Sh. flexnerii, S. typhi, E. coli).

În *apa de conductă* enterovirusurile pot supraviețui 75, 168 și chiar peste 200 de zile în funcție de temperatura acesteia (Bagdasarian și Abieva, 1971; Melnick și Gerba, 1980; Mayr, 1980).

În ceea ce privește *sedimentele* și *nămolurile*, așa cum am arătat, acestea au un efect protector ceea ce contribuie la prelungirea duratei de supraviețuire a enterovirusurilor (La Belle și Gerba, 1982).

În anul 1971, Bagdasarian și Abieva au arătat că virusul ECHO7 a supraviețuit 200 de zile în sedimentul apelor reziduale iar Subrahmanyan (1977) a constatat că în apa de canal și în nămol durata de supraviețuire a virusurilor Coxsackie B5 și ECHO tip 9 a variat între 10 și 12 săptămîni, de unde necesitatea prelucrării sedimentului apelor reziduale înainte de a fi utilizat ca îngrășămînt pentru terenurile agricole. Smith și colab. (1978) au studiat durata de supraviețuire a patru tulpini de enterovirusuri (ECHO tip 1, Coxsackie, B3, A9 și polio tip 1) în sedimentul estuarului unui fluviu și în apele marine respective. Timpul de supraviețuire a fost mai mare în sediment decît în apă și a atins 18 zile pentru virusurile ECHO tip 1 și Coxsackie B3, 14 zile pentru virusul polio tip 1 și 4 zile pentru Coxsackie A9.

Lien și Gerba (1979) au demonstrat, la rîndul lor, că sedimentele marine pot constitui adevărate rezervoare de enterovirus, prin contaminarea experimentală a apei marine, cu și fără sediment, cu poliovirus tip 1, luat ca indicator.

5.1.5. ÎNDEPĂRTAREA ENTEROVIRUSURILOR DIN APĂ

Există astăzi un număr foarte mare de date care indică că enterovirusurile sînt mult mai rezistente la tratarea apelor în comparație cu bacteriile și că absența acestor din urmă microorganisme nu exclude posibilitatea unei poluări virale a apei.

În sprijinul acestor afirmații vin investigațiile care demonstrează prezența enterovirusurilor în apele care au fost supuse mijloacelor de tratare uzuale în vederea utilizării lor ca surse de apă potabilă. S-a dovedit astfel că apa rîului Tamisa (Freeman și colab., 1976) se debarasează abia în 10 zile de 99% din totalul enterovirusurilor, iar studiile efectuate în vederea aprecierii poluării virale a rîului Ottawa (Sattar și Westwood, 1978) au arătat că virusurile erau prezente în aproximativ 80% din probele de apă reziduală neprelucrată ce se deversa în acest rîu, în 72% după clorinarea primară și în 56% din probele de apă după clorinare. Procesul de clorinare a scăzut doar cantitatea de unități virale infectate de la ~100 pînă la 2,7/100 ml apă.

După Bagdasarian (1977) eficiența epurării apelor reziduale studiată în patru mari stații urbane de epurare din U.R.S.S., printre care și cea a orașului Moscova, a fost de 60—87%.

Rezultatele privind investigațiile asupra eficienței tratării diferitelor categorii de apă sînt neconcordante și dificil de comparat din cauza imperfecțiunii metodelor de evidențiere a enterovirusurilor și a rezistenței inegale a variatelor tipuri antigenice față de mijloacele de tratare curente. Poliovirusurile sînt îndepărtate cel mai ușor, în timp ce unele tulpini de virusuri Coxsackie și ECHO sînt numai parțial îndepărtate (Melnick și colab., 1978). După Mahdy (1979), în urmărirea eficienței măsurilor

Scanned with OKEN Scanner

de epurare a apelor este necesar a se utiliza cele mai rezistente enterovirusuri, cum ar fi virusul Coxsackie A6.

Procedeele de îndepărtare a virusurilor din apă se pot împărți, după Melnick și colab. (1978), în procedee fizice (sedimentare, adsorbție, coagulare, precipitare și filtrare) și procedee de inactivare prin dezinfecție cu mijloace fizice sau chimice.

5.1.5.1. **Procedee fizice.** a) *Sedimentarea.* Sedimentarea simplă are ca efect o diminuare a conținutului în virusuri care poate atinge chiar proporția de 86—95% (Melnick și colab., 1978; Rao și colab., 1981). Aceasta se realizează datorită unui proces de adsorbție a virusurilor pe particule solide din lichid. Eficiența sedimentării simple va depinde, deci, de cantitatea și mărimea particulelor solide din apă și, în plus, de temperatura și viteza de sedimentare a acesteia.

Pentru ameliorarea depunerilor s-a preconizat sedimentarea accelerată care se realizează prin adăugarea unor coagulanți chimici (ioni metalici ca sulfat de aluminiu, sulfat feros, sulfat feric, clorură ferică etc.) sau a unor coagulanți naturali (polielectroliți, bentoniți, argile etc.). Se formează astfel flacoane de hidroxid avînd o încărcătură electrică pozitivă pe care se adsorb particulele coloidale cu încărcare electrică negativă inclusiv virusurile. În timpul procesului se produce degajare de bioxid de carbon liber ceea ce determină modificarea pH-ului și reclamă corectarea acestuia cu ajutorul hidroxidului de calciu (var) sau a carbonatului de sodiu (sodă calcinată). Se obține astfel o mare reducere de virusuri care poate atinge proporția de 99,99% dacă nivelul pH-ului este menținut peste 11 o perioadă suficient de lungă (Berg, 1973; Wolf și colab., 1974; Malek și colab., 1981).

York și Dreway (1974) au studiat comparativ eficiența diferiților coagulanți din punctul de vedere al îndepărtării bacteriofagului f2, luat ca indicator pentru enterovirusuri. Autorii au constatat că sulfatul de aluminiu (20—25 mg/l) și clorura ferică (50 mg/l) determină o reducere de peste 99% a virusurilor și peste 90% a turbidității. După acești autori cele trei tipuri de polielectroliți utilizați în combinație cu sulfatul de aluminiu nu au crescut semnificativ eficiența îndepărtării virusurilor.

Varul stins adăugat în apele reziduale și în sedimentul acestora permite îndepărtarea fosfaților și, totodată, o oarecare scădere a titrului enterovirusurilor însă fără a determina eliminarea lor definitivă, 80% din probe rămînînd pozitive din punct de vedere virusologic (Sattar și Ramia, 1978).

Studiile efectuate pe enterovirusuri au demonstrat că prin coagulare se formează complexe cation-virus care se sedimentează, dar procesul nu duce la inactivarea virusurilor, apa rămînînd potențial infectantă dacă se creează condiții de eluție a virusurilor. Acest fenomen este utilizat, așa cum am arătat, ca o metodă de concentrare a virusurilor din apă în vederea izolării lor.

Recent, Block și colab. (1978b) au aplicat o metodă în care hidroxidul de fier din depunerile stațiilor de epurare a apelor reziduale era deshidratat prin congelare-decongelare, ceea ce reduce eluția particulelor virale adsorbite pe floculate și duce chiar la dispariția lor dacă se repetă cîteva cicluri de congelare-decongelare. Cu cît densitatea sedimentului este mai mare cu atît eficiența prelucrării este mai bună. Totuși, această metodă nu poate fi considerată nici ea ca un mijloc sigur de epurare a apei de virusuri.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Adsorbția.* Adsorbția enterovirusurilor se poate realiza pe o largă gamă de suprafețe cum ar fi cărbune activat, cărbune, sticlă, filtre-membrane, materii coloidale organice, argile, sol, pămînt oligobazic etc. După Berg (1973), argila și cărbunele activat posedă o putere adsorbandă rapidă asupra virusurilor dar activitatea lor este insuficientă. Aceasta se datorează faptului că adeseori apare eluția virusurilor prin alterarea echilibrului ionic sau a pH-ului sau prin intervenția materiilor organice competitive. Se admite că pe cărbune activat cantitatea de virusuri adsorbite este invers proporțională cu concentrația substanțelor organice și depinde într-o mare măsură de pH.

În ceea ce privește adsorbția pe argilă, Shaub și colab. (1974) au urmărit corelația dintre prezența enterovirusurilor polio tip 1 și Coxsackie B2 și turbiditatea naturală a mediului hidric. S-a constatat că peste 93% din virusuri s-au adsorbit ușor pe argilă. Cationul bivalent ($CaCl_2$) în limitele de 0,001—0,005 M sporea capacitatea de adsorbție a virusului pe particulele solide din suspensie în timp ce cationul monovalent (NaCl) se consuma în cantități de 100 de ori mai mari pentru o adsorbție echivalentă a virusului.

Adsorbția magnetică constituie un alt procedeu rapid și practic de epurare a apelor reziduale fiind aplicat de Bitton și colab. (1977) pentru eliminarea enterovirusurilor din sistemele de acvacultură marină pentru algele *Skeletonema costatum* și *Phacodactylum capricornutum* care nu sînt influențate de acest tratament. Procedeul constă din adsorbția virusurilor pe „granule" magnetice urmată de eliminarea acestora prin filtrare prin matricea din oțel inoxidabil, în afara cîmpului magnetic. S-a demonstrat că eliminarea poliovirusului tip 1 într-un asemenea amestec variază între 98,6 și 99,0%. Pentru această metodă nu este necesar corectarea pH-ului.

În 1977, Lo și Sproul au cercetat eficiența metodei de adsorbție a virusurilor (polio tip 1) din apele naturale și reziduale, cu ajutorul mineralelor silicate. Gradul de ionizare a proteinei învelișului este una din caracteristicile principale de suprafață ale virusului care se reglează prin valoarea pH-ului din mediu. La creșterea pH-ului ionizarea grupurilor aminice scade, iar cea a grupurilor carboxilice crește, virusurile comportîndu-se ca anioni. S-a constatat că mineralele silicate (actinolit, enstatit, kianit, microclin, olivin și selemonit) au îndepărtat între 51 și 78% din totalul virusurilor; adsorbția virusurilor creștea odată cu aciditatea mineralelor silicate; procesul de dezadsorbție a virusurilor în prezența substanțelor organice a variat între proporțiile de 38 și 64% din virusurile adsorbite; mineralul cu capacitatea maximă de a reține virusurile a fost selemonitul.

c) *Filtrarea* diferitelor categorii de apă se poate realiza rapid sau lent. Filtrarea rapidă se poate face prin trecerea liberă sau sub presiune a apei printr-un strat de nisip, prin strat dublu (antracit + nisip) sau prin filtre de contact. S-a stabilit că filtrarea rapidă prin nisip nu exercită influență asupra conținutului de virusuri în apă (Berg, 1973; Guy și colab., 1977; Freeman, 1978). Aceasta s-ar datora faptului că materialele folosite pentru filtrare capătă în apă sarcini negative, ca și virusurile și particulele coloidale, ceea ce duce la respingerea lor electrostatică. Fenomenul se poate corecta prin acoperirea materialului folosit pentru filtrare cu polielectroliți cationici sintetici (Purifloc C-31, Celita, Hyflo Super Cel etc.). Cu cît dimensiunea particulelor este mai redusă cu atît suprafața de adsorbție este mai mare și deci filtrarea mai eficientă. Substanțele organice care, la rîndul lor, perturbează adsorbția virusurilor pot fi

Scanned with OKEN Scanner

eliminate cu cărbune activat. În țara noastră, Nestor și Costin (1971a) au studiat capacitatea filtrantă a nisipului uscat și a celui utilizat într-o stație de captare a apei de a elimina virusurile Coxsackie. S-a constatat că nisipul uscat avea o capacitate neînsemnată de a elimina virusuri în timp ce pentru nisipul umed această capacitate era mult mai mare.

Brown și colab. (1974) au studiat posibilitățile de utilizare a pămîntului de siliciu (diatomee) în diferite tipuri de filtre pentru eliminarea poliovirusului tip 1, luat ca indicator. S-a constatat că prin filtrare s-au eliminat peste 98% din virusuri. Adăugarea polimerului C-31 în combinație cu Hyflo contribuia la eliminarea completă a virusurilor.

Filtrarea lentă se face prin trecerea apei cu o viteză de 0,1 m pe oră printr-un strat de nisip la suprafața căruia, după o perioadă de maturare de 1, 3, 8 și chiar 12 zile, se formează o membrană biologică de microorganisme vegetale și animale cu putere adsorbantă. Din punctul de vedere al îndepărtării virusurilor, filtrarea lentă apare mai eficientă, adîncimea stratului de nisip avînd o importanță mai mare în gradul de eliminare a virusurilor decît suprafața sa (Berg, 1973; Freeman, 1978).

De remarcat că virusurile adsorbite pe filtre nu se inactivează ceea ce face ca ele să rămînă periculoase pentru sănătatea omului.

Una dintre metodele cele mai apreciate de epurare a apelor reziduale din punctul de vedere al enterovirusurilor o constituie metoda nămolului activat care constă dintr-o instalație care asigură o aerare permanentă a nămolului, gradul și mecanismele de inactivare constituind obiectul mai multor investigații (Hugues și colab., 1980; Vilker și colab., 1980; Glass și O'Brien, 1980). Malina și colab. (1974) studiind comportarea enterovirusurilor inoculate zilnic în sistemele de aerotancuri și de stabilizatoare de contact (construite în laborator) au arătat că după 8 zile capacitatea inactivantă a nămolului nu se modifică atingînd în medie o scădere de titru de peste 98% al virusului. După acești autori, are loc un proces de adsorbție aproape imediată, nămolul păstrîndu-și capacitatea de regenerare a noilor suprafețe adsorbante. După Farrah și colab. (1978) prelucrarea poliovirusului cu nămol activ a redus titrul cu 0,7—1,0 log. Inactivarea virusurilor în nămolul activat al apelor reziduale se datorează unor procese microbiologice, biochimice și oxidoreducătoare. Gradul de eliminare al virusurilor depinde de încărcarea și aerația rezervoarelor cu nămol activ.

Fermentarea anaerobă utilizată pentru epurarea apelor uzate a constituit, de asemenea, obiectul unei serii de studii. Astfel, Palfi (1972) a comparat eficiența metodei curente de fermentare (timp de 21 de zile la 30°C cu amestecare continuă) cu o metodă modificată care constă din fermentarea la 33°C timp de 40 de zile din care 30 cu și 10 fără amestecare. Această din urmă metodă s-a dovedit mai eficientă, 85% din probe fiind lipsite de enterovirusuri. Ward și Ashley (1977) au identificat în nămolul apelor reziduale prelucrate în tancul anaerob un compus care inactivează ireversibil enterovirusurile și care era absent în lichidul rezidual inițial, neprelucrat. Autorii au constatat, utilizînd poliovirusul ca indicator că, în aceste condiții are loc biodegradarea ARN-ului și a două proteine macromoleculare, dar nu au reușit să descifreze în totalitate mecanismul de inactivare a virusului. Compusul inactivant a fost izolat și identificat ca amoniu. Clorura de amoniu la un pH 9,5 inactiva experimental virusurile polio 1 și 2, Coxsackie A13 și ECHO 11, dar nu influența reovirusul tip 3.

Scanned with OKEN Scanner

5.1.5.2. **Dezinfecţia.** Dezinfecţia este o etapă obligatorie pentru tratarea apelor care urmează a fi utilizate în scop potabil, fiind în stadiul actual metoda cea mai larg răspîndită în acest scop. Dezinfecţia apelor se poate realiza fie prin metode fizice, fie — de preferinţă — prin metode chimice.

a) *Metode fizice. Inactivarea termică.* Metoda cea mai veche şi cea mai simplă de îndepărtare a bacteriilor şi virusurilor din apa potabilă, inactivarea termică mai constituie şi astăzi obiect de studiu. Astfel, Mahnel (1978a) a studiat posibilitatea inactivării termice a poliovirusului şi virusului ECHO în condiţii de teren. Simpla încălzire la 56°C şi la 60°C a permis inactivarea virusului ECHO abia în 60 şi, respectiv, 20 de minute. Poliovirusul a rezistat la 80°C timp de 1 oră. Adăugarea de cloramină T, perhidrol sau peroxid de sodiu a crescut eficienţa metodei, dar în concentraţii care fac apa neutilizabilă pentru consum.

Fotoinactivarea. În condiţii naturale, radiaţiile solare şi ultraviolete sînt factori care duc la inactivarea enterovirusurilor în apele reziduale, aceste radiaţii fiind mai puternice în sezonul de vară decît în sezonul de iarnă. În anul 1979 (b), Bitton şi colab. au studiat experimental inactivarea enterovirusurilor prin radiaţii solare. Autorii au expus pe acoperişul uneia din clădirile Universităţii din Florida apă de fîntînă, contaminată cu poliovirus luat ca indicator, la lumină solară şi la temperatura de 25° în vase transparente şi, comparativ, în vase opace. S-a constatat că virusurile se inactivau numai în vasele transparente permeabile razelor solare în timp ce virusurile din vasele opace nu erau influenţate. Distrugerea virusurilor avea loc mai rapid în primele 20 de minute (aproximativ 30 %) apoi viteza de inactivare scădea treptat ajungîndu-se după 90 minute la o distrugere de 75 % din totalul virusurilor iar pentru o inactivare de 90 % au fost necesare 3 ore, timp mult mai crescut în comparaţie cu cel necesar pentru inactivarea coliformilor (20 min). Adăugarea de argilă (500 ppm montronit) reducea viteza de inactivare a poliovirusului, ceea ce demonstrează că fotoinactivarea se realizează cu mai multă uşurinţă în apele transparente.

Gerba şi colab. (1977a) au demonstrat că fotoinactivarea enterovirusurilor se realizează mai uşor în prezenţa albastrului de metilen. Curba fotoinactivării a fost bifazică, după autori fiind vorba de un proces de şocuri multiple.

Iradierea. Acţiunea inactivantă a diferitelor radiaţii asupra enterovirusurilor este demult cunoscută. Unii cercetători consideră că razele ultraviolete şi radiaţiile gama ar fi mai recomandabile în comparaţie cu clorinarea, ţinînd seama de cancerogenitatea şi teratogenitatea compuşilor clororganici rezultaţi din dezinfecţia apei.

În anul 1971, Cerkinski şi colab. au studiat acţiunea razelor U.V. (lampa DB-30-P la distanţa de 50 cm) şi a razelor gama asupra poliovirusului şi, comparativ, a b.coli din 10 ml de apă autoclavată contaminată experimental şi expusă în petriuri. S-a constatat că viteza de distrugere a b.coli a fost de cîteva ori mai crescută faţă de poliovirus.

Epp şi Metz (1980) au studiat inactivarea virusurilor în diferite categorii de apă şi în nămol. În probele iradiate cu 300-400 K rad (sursa de radiaţii Co^{60}) timp de 3,5 ore, titrul virusurilor a fost mai scăzut ($10^{4,5}$—$10^{6,7}$ DCP_{50}/0,1 ml). în comparaţie cu probele martor ($10^{6,3}$—10^{8} DCP_{50}/0,1 ml). Mecanismul de inactivare a enterovirusurilor prin acţiunea radiaţiilor ionizante a fost studiat de Ward (1980) care a arătat că inactivarea se produce prin deteriorarea structurii ARN, pierderea capacităţii

Scanned with OKEN Scanner

virusului de a se fixa pe celulele HeLa şi pierderea infecţiozităţii lui. Metoda, utilizînd electroni accelerați sau radiațiile gama a fost aplicată pentru dezinfecţia apelor reziduale şi a sedimentelor acestora (Lessel şi Swess, 1978; Tarasov, 1981).

Alte procedee fizice. Mahnel (1978b) a propus un procedeu modern de inactivare a virusurilor prin oxidare anodică. Autorul a studiat acţiunea inactivantă a oxidării anodice în sistemul de electroliză hidrică (200—300 mA) faţă de 11 tipuri de virusuri dintre care şi virusurile polio şi ECHO. S-a constatat că eficienţa metodei depinde de circuitul apei, gradul de electroconductibilitate a acesteia, concentraţia virusului, pH-ul mediului şi temperatură.

b) *Metode chimice. Clorinarea.* Este incontestabil că metoda cea mai larg răspîndită şi, totodată, cea mai eficientă de dezinfecţie a apei, dacă este efectuată corect, o constituie clorinarea care se poate realiza fie cu clor gazos, fie cu substanţe clorigene. Inactivarea virusurilor reuşeşte atunci cînd în apa tratată rămîne clor rezidual liber într-o cantitate suficientă şi care diferă de la o categorie de apă la alta, efectul virulicid al clorului liber fiind de peste 100 de ori mai mare în comparaţie cu clorul combinat (O.M.S., 1979).

Eficienţa clorinării depinde de un număr mare de factori ca: temperatura, pH-ul, prezenţa de materii organice, timpul de contact, starea fizică a virusului (adsorbit, agregat etc.), cantitatea de amoniu etc., studiaţi în detaliu de numeroşi cercetători (Hajenian şi Butler, 1980; Snead şi colab., 1980; Sharp şi Leong, 1980). O documentată lucrare privind condiţiile inactivării virusurilor în apă prin clorinare a fost publicată de Nestor (1978). Timpul de inactivare (peste 99%) a poliovirusului, luat ca indicator, în diferite condiţii de temperatură, pH şi pentru diferite categorii de apă este redat în tabelul 5.6, reprodus după articolul amintit.

Foliguet şi Doncoeur (1974) s-au preocupat de inactivarea enterovirusurilor prin clorinare dincolo de „punctul critic sau de rupere" (nivelul cînd apare în apă clorul liber). Pentru a se obţine inactivarea, autorii pretind următoarele condiţii: a) turbiditatea apei să fie sub 1,0 unităţi Jackson; b) pH-ul să fie de 7,5 pentru apele care conţin amoniu şi de 7,0 pentru cele fără; c) amestecarea apelor să fie rapidă şi d) concentraţia acidului hipocloros — de 0,5 — 1,0 mg/l — să fie menţinută cel puţin 30 de minute.

În ceea ce priveşte pH-ul, Kott şi colab. (1975) au arătat că acidul hipocloros (HOCl) care se formează la pH 6 exercită un efect virulicid superior faţă de ionii de hipoclorură (OCl^-) care se formează la pH 10.

Cu mulţi ani în urmă, se stabilise că sub 0,5 ml/l cantitate de clor rezidual (prezentă la o prelucrare curentă a apei potabile) nu se poate asigura inactivarea poliovirusului pătruns ca urmare a unei contaminări secundare (Lovţevici, 1973; Petrilli şi colab., 1974). Mai recent, pe baza rezultatelor investigaţiilor în acest domeniu se apreciază că dozele de clor rezidual liber necesare pentru inactivarea enterovirusurilor sînt, în realitate, mult mai mari. Kazanţeva şi colab. (1978 a, b) ca urmare a unor experimentări efectuate în staţia de epurare din Moscova au ajuns la concluzia că pentru o dezinfecţie eficientă a apelor reziduale care au trecut prin prelucrare mecanică, biologică şi suplimentară este necesară doza minimă de 1 mg clor/l şi un timp de contact de 60 de minute.

În anul 1978, Vorobieva şi colab. studiind acţiunea dezinfectantă a hipocloritului de sodiu asupra virusurilor Coxsackie B1-6 ajung la concluzia că doza echivalentă cu 10 mg clor activ/l asigură o inactivare com-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.6

Efectul clorinării apei asupra virusului poliomielitic, în raport cu puritatea apei (Nestor, 1978 b)

Gradul de purificare a apei clorinate	Gradul de purificare a suspensiei de poliovirus	Temperatura (C°)	pH	Clorul rezidual (ppm)		Timpul de contact al apei cu clorul (minute)	Gradul de inactivare a virusului (%)
				Liber (Cl_2)	Combinat (cloramină)		
Apă uzată sedimentată	Purificată parţial	20	7,1		30–37 33–43	30 30	99,90 99,99
Apă uzată epurată	„	20	7,25	0,20–0,40		30	100,00
Apă bidistilată	„	20	6–7	0,10 0,25 0,50–0,75		5,25 3,25 1,25	99,79 >99,993 >99,993
Apă bidistilată + 0,001 KOH (electrolit)	„	20	6–7	0,10 0,25–0,50 0,75		5,25 2,25 1,25	95,43 >99,9978 >99,9978
Apă de robinet + 0,03 mg Cl_2/l	„	20	6–7	0,10 0,25 0,50–0,75		5,25 2,25 1,25	99,79 >99,993 >99,993
Apă de fîntînă	„	20	6–7	0,10 0,25 0,50 0,75		5,25 5,25 5,25 1,25	99,53 99,79 >99,9978 >99,9978

Scanned with OKEN Scanner

pletă a virusurilor în 1—2 ore la temperatura de 2—4°C şi în 18 ore la temperatura de 18—20° C. Dozele mai mici nu asigură inactivarea virusurilor nici după 18 ore de acţiune. Virusurile rezistente timp de 18 ore la acţiunea hipocloritului de sodiu în doză de 10 mg clor activ/l au fost distruse în 20 minute dacă în prealabil prin apa contaminată s-a trecut un curent electric continuu cu tensiunea cîmpului de 60 V/cm timp de 3 minute.

Gowda şi colab. (1981) au propus pentru dezinfecţia apei înlocuirea clorului gazos cu cloramina T în mediu acid, cinetica inactivării virusurilor fiind similară cu cea după clorinare.

După Melnick şi colab. (1978) în apele în care există o concentraţie mare de materii organice, acizi aminaţi sau compuşi amoniacali eficienţa clorinării este îndoielnică din cauză că clorul se combină cu substanţele menţionate. În aceste condiţii aplicarea a 8 mg clor rezidual/l nu s-a arătat eficientă, doza necesară pentru distrugerea a 99,99% din cantitatea de virusuri atingînd valoarea foarte crescută de 40 mg/l timp de 10 minute. Aceste doze mari de clor, însă, sînt costisitoare şi toxice pentru o mare varietate de forme de viaţă. În plus, există pericolul de producere a unor substanţe toxice stabile şi produşi secundari avînd potenţial cancerogen ca hidrocarburile clorinate ş.a. (Berg şi colab., 1979).

Altă dificultate în dezinfecţia prin clor este reprezentată de marea variabilitate a sensibilităţii diferitelor tipuri antigenice de enterovirusuri la inactivare prin clor (Jensen şi colab., 1980) şi de dezvoltarea progresivă a rezistenţei la clor a unor tulpini de virus. Melnick şi colab. (1978) relatează că într-un studiu asupra rezistenţei a 25 de tipuri de enterovirusuri umane s-a constatat că timpul pentru inactivarea a 99,99% din cantitatea lor a variat de la 3 minute la 2 ore. Diferenţe privind sensibilitatea diferitelor tipuri antigenice de enterovirusuri au fost constatate şi de alţi autori (Engelbrecht şi colab., 1980).

Lovţevici (1973) a arătat că dinamica inactivării poliovirusurilor la clor nu este uniformă. Cea mai mare cantitate a virusului se inactivează în primul interval, în timp ce o mică parte (0,5—1,0%) din populaţia virală se inactivează foarte lent. Această din urmă parte de populaţie virală nu este heterogenă genetic faţă de partea principală, nu este alcătuită din ARN activ ci, probabil, reprezintă aglomerate de corpusculi virali. Pentru verificarea ipotezei după care rezistenţa virusurilor la clor s-ar datora formării conglomeratelor de virusuri, Zotova şi Doskina (1977) au studiat influenţa ultrasunetelor asupra bacteriofagului f-2 luat ca indicator. La doza de 3 mg clor rezidual/l titrul fagului din apa prelucrată cu ultrasunete a scăzut cu 5 log faţă de 3 log din proba martor, ceea ce se datorează, evident, descompunerii conglomeratelor şi deci unui contact mai intim al clorului cu virusul.

Un raport recent asupra dezvoltării progresive a rezistenţei la clor a unei tulpini de poliovirus după o serie de expuneri experimentale repetate la doze subletale a evidenţiat posibilitatea dezvoltării clor-rezistenţei enterovirusurilor în natură. Astfel, Bates şi colab. (1977) au inactivat poliovirusul cu clor în 10 cicluri succesive, demonstrînd că rezistenţa virusului faţă de clor creştea treptat. La al 10-lea ciclu virusul s-a menţinut viabil o perioadă mai îndelungată şi la un titru mai ridicat. Bazele moleculare ale acestui fenomen n-au fost studiate. Young şi colab. (1977) au demonstrat acelaşi fenomen pentru virusul ECHO-1 care devine, într-o anumită perioadă de timp, rezistent la acţiunea clorului. Autorii nu au constatat deosebiri genetice pentru această fracţie. Ei consideră

Scanned with OKEN Scanner

că agregarea virionilor nu influenţează forma curbei de inactivare şi că rezistenţa trecătoare a virionilor este condiţionată de componenţa particulară a proteinei capsidice care întîrzie pătrunderea HOCl. Dealtfel, deşi clorinarea a constituit principala metodă de dezinfecţie a apei în ultimii 50 de ani, mecanismul prin care virusurile devin neviabile nu este, încă, bine cunoscut.

În concluzie, după experţii O.M.S. (1979), apele reziduale înainte de a fi evacuate în mediul extern vor fi dezinfectate în mod curent cu clor. Prezenţa materiilor organice, o durată insuficientă de contact sau un dozaj insuficient, prezenţa de amoniac, anumite condiţii de temperatură sau pH pot anula în totalitate efectul dezinfectant al clorului, ceea ce se demonstrează prin izolarea virusurilor din efluenţii clorinaţi. În plus, în apa tratată se pot forma produşi chimici indezirabili, cu acţiune cancerigenă. Pentru o apă de suprafaţă cu o turbiditate slabă este necesar o cantitate de clor liber rezidual de 2,3—2,5 mg/l timp de 30—60 minute. În ceea ce priveşte apa de băut, după Comitetul AWWA se tinde ca nivelul de clor liber să fie menţinut la 0,2 mg/l pentru a se asigura o profilaxie eficientă împotriva poluărilor secundare.

Ozonizarea. Se consideră că ozonul exercită o acţiune de 10 ori mai rapidă şi mai puţin toxică decît clorul ceea ce a făcut ca acesta să fie utilizat în multe părţi ale lumii ca dezinfectant al apei. Katzenelson şi colab. (1974, 1979) au arătat că procesul de inactivare a enterovirusurilor (model poliovirus tip 1) se desfăşoară în două faze: prima scurtă, de 8 secunde, în care se inactivează 99,0—99,5% din virusuri şi cea de a doua prelungită, de 1—5 minute, în care inactivarea ajunge la 100%.

Keller şi colab. (1974) au studiat posibilitatea folosirii ozonului pentru decontaminarea apei de virusul polio şi de Coxsackie B3, după filtrarea prin coloane cu carbon adsorbant. În urma acestei epurări a apei turbiditatea ei scădea pînă la 1 unitate Jackson. Inactivarea completă a virusurilor se obţinea cu doze de ozon de 1,53 mg/l. De remarcat că pentru inactivarea virusurilor era suficientă o cantitate chiar mai redusă de ozon, de 1,13 mg/l, în timp ce pentru inactivarea microbilor doza de ozon trebuia să fie în unele situaţii chiar peste 1,25 mg/l. A mai fost studiată acţiunea ozonului asupra virusurilor adsorbite pe bentonită (Boyce şi colab., 1981) sau pe hidroxid de aluminiu (Walsh şi colab., 1980), eficienţa dezinfecţiei fiind superioară în aceste condiţii.

Eficienţa virulicidă a ozonului scade atunci cînd în apa respectivă există substanţe care intră în reacţie cu ozonul şi îi scad concentraţia reală. Katzenelson şi Biedermann (1976) au efectuat experimentări privind acţiunea ozonului asupra poliovirusului prin două procedee. În primul caz ozonul era adăugat în apa respectivă sub formă de soluţie. Ozonul dispărea imediat, titrul viral scădea dar, în continuare, se menţinea un timp îndelungat la un nivel scăzut. Gradul de inactivare era mai mare pentru apele cu un conţinut redus de substanţe organice. În cel de-al doilea caz ozonul era suflat în apele reziduale. Inactivarea începea în aproximativ 30 de secunde. La un conţinut de ozon rezidual de 0,6 ml/l s-a obţinut o inactivare de 99,99% a virusurilor, ceea ce demonstrează că ozonul poate fi utilizat sub această formă şi în cazul apelor impurificate. La rezultate similare a ajuns şi Roy şi colab. (1981) Traenhart şi Kuwert (1975), efectuînd studii comparative asupra acţiunii dezinfectante a ozonului şi clorului au arătat că viteza iniţială şi cinetica inactivării poliovirusului, luat ca indicator, a fost identică pentru ambele substanţe. Efec-

Scanned with OKEN Scanner

tul dezinfectant al ozonului s-a obţinut la o concentraţie de 1,0—1,5 mg/l. Pentru obţinerea ozonului a fost utilizat aparatul tip Lab-70 prin acţiunea descărcărilor electrice asupra oxigenului uscat.

După Melnick şi colab. (1978) principalul inconvenient al ozonului constă din faptul că acesta lasă un efect rezidual slab, avînd un timp de înjumătăţire de numai 25 minute.

Alte mijloace. Utilizarea bromului ca metodă de inactivare a enterovirusurilor din apă a fost studiată luînd ca model tot poliovirusul, fiind considerată de unii autori cu rezultate mai bune decît clorul (Keswick şi colab., 1979). Prelucrarea apei cu iod, hipoclorit de Ca şi permanganat de K, după Mahnel (1978a), este acceptabilă datorită acţiunii puternice de contact a acestor substanţe, iar iodizarea este reco mandată de autor ca cea mai convenabilă metodă în condiţiile de teren dar pentru cantităţi mici de apă.

În rezumat, dezinfecţia apei nu este totdeauna uşor de realizat, eficienţa ei fiind dependentă în primul rînd de categoria de apă supusă tratamentului. Dacă o apă perfect clară este relativ uşor de dezinfectat, pentru apa care conţine materii organice sau substanţe solide se ridică o serie de inconveniente de unde necesitatea de a găsi cele mai bune metode pentru a face ca din efluenţi şi din apele brute să dispară substanţele care contracarează procesul de dezinfecţie. Tehnicile care antrenează o creştere a pH-ului sînt în mod special recomandate în acest scop, deoarece o alcalinitate puternică are un efect distructiv asupra virusurilor.

Supraclorinarea, propusă de unii autori, trebuie să fie urmată de declorinare cu bioxid de sulf sau tiosulfat de sodiu. O soluţie preferabilă constă din preclorinarea apei prin adăugarea unei cantităţi mai mari de clor o dată cu coagulantul, ceea ce nu este posibil la clorinarea finală (Berg, 1973; Petrilli şi colab., 1974).

Apele reziduale destinate a fi deversate în cursuri de apă nu trebuie să fie dezinfectate cu ajutorul unor produse toxice susceptibile de a leza viaţa acvatică, decît cu condiţia de a fi apoi neutralizate. În ceea ce priveşte apa de băut, apare necesară dezinfecţia „forţată" prin clor sau, de preferat, prin ozon. Întrucît, însă, utilizarea acestuia din urmă nu se poate face pe scară largă, metoda de bază rămîne clorinarea. Apare necesară evaluarea cu toată responsabilitatea a cancerogenităţii, teratogenităţii şi toxicităţii compuşilor clororganici sau înlocuirea acestui mod de dezinfecţie cu alte mijloace noi cum ar fi razele ultraviolete sau iradiaţiile gama.

În ceea ce priveşte metodele de îndepărtare a virusurilor în general, evaluarea eficienţei acestora necesită, încă, studii de teren şi de laborator, acestea din urmă fiind strîns legate de necesitatea elaborării unor metode simple şi eficace de izolare a virusurilor în volume mari de apă. Deoarece s-a constatat că frecvenţa enterovirusurilor în sedimentele fluviale şi oceanice este mai mare chiar decît în apele respective, apare necesară elaborarea unor procedee de eliminare a virusurilor şi din aceste obiective, în vederea reducerii pericolului pe care îl prezintă pentru sănătatea populaţiei.

BIBLIOGRAFIE

AIZEN M. S., KAZANTEVA V. A., DROZDOV S. G., SADOVSKII B. F., BAZAROV A. P. (1979), *Konţentrirovanie virusa poliomielita iz vodi na materiale marki F.P*, Vopr. Virusol., *5*, 554—558.

Scanned with OKEN Scanner

AIZEN M. S. (1982), *Kalicestvenoe opredelenia enterovirusov v vode*. Ghig. Sanit., *1*, 62—65.
ALBERTSSON PER-AKE (1974), *Concentration of virus by phase partition*. In : *Virus survival water and wastewater*, Austin, p. 16—18.
BAGDASARIAN G. A., ABIEVA P. M. (1971), *Vijivaemosti entero i adenovirusov v vode*, Ghig. Sanit., *3*, 10—13.
BAGDASARIAN G. A. (1977), *Efectivnosti metodov ocistki i obezzarajivnie stocinih vod v otnoşenii kişecinih virusov*. In : *Osnovi sanitarnoi virusologhii*, Ed. Mediţina, Moscova, pp. 146—153.
BAGDASARIAN G. A., TALAEVA I. G., ARTEMOVA T. Z., NEMÎREA V. I., NEDACIN A. E. (1980), *Osobenosti sanitarno-microbiologhicescoi oţenki cacestva pribrejnih morschih vod v usloviah ih promîşleno-bitovogo zagreznenia*. Ghig. Sanit., *8*, 5—8.
BAGDASARIAN G. A., MÎSLEAEVA L. A., NEDACIN A. E. (1982), *Rasprostranenie enterovirusov v vode vodoemov raznih climaticeschih zon strani*, Ghig. Sanit., *5*, 11—13.
BATES R. C., SHAFFER P.T.B., SUTHERLAND S. M. (1977), *Development of poliovirus having increased resistance to chlorine inactivation*, Appl. environ. Microbiol., **34**, *6*, 849—853.
BERG G. (1973), *Removal of viruses from sewage, effluents and waters*. Bull. W.H.O., **49**, *5*, 451—469.
BERG J. D., ROBERTS P. V., COOPER R. Ş. (1979), *Viral and bacterial indicators of disinfection by chlorine deoxide in waste water*. Abst 79th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los Angeles, p. 229.
BERG G., DAHLING D. R. (1980), *Method for recovering viruses from river water solids*. Appl. environ. Microbiol., **39**, *4*, 850—853.
BERMAN D., ROHR M. E., SAFFERMAN S. (1980), *Concentration of poliovirus in water by molecular filtration*, Appl. environ. Microbiol., **40**, *2*, 426—428.
BERNADEZ I., TORANZO A. E., MORA A. E., BARJA I. L. (1977), *Enterovirus isolation from the Galician littoral water; concentration methods*, Rev. int. Oceanogr. Méd., **48**, *2*, 27—31.
BITTON G., MONTEITH C., PANCORBO O., GIFFORD G. E. (1977), *Virus removal in main aquaculture systems*, Rev. int. Oceanogr. Méd., **48**, *2*, 47—52.
BITTON G., FELDBERG B. N., FARRAH S. R. (1979a), *Concentration of enteroviruses from seawater and tapwater by organic flocculation using non-fat dry milk and casein*, Water, Air, Soil Pollut., **12** *2*, 187—195.
BITTON G., FRAXEDAS R., GLIFFORD G. E. (1979b), *Effect of solar radiation of poliovirus : preliminary experiments*, Water Res., **13**, *3*, 225—228.
BLOCK J. C., DIXNEUF F. P., SCHWARTZBROD L., FOLIGUET J. M. (1976), *Utilization d'une méthode de filtration sur ultrafiltre soluble pour la mise en évidence des virus dans le milieu hydrique : étude quantitative*, Microbia, **2**, *1*, 33—44.
BLOCK J. C., JORET J. C., HARTEMANN P., SCHWARTBROD L., DIXNEUF P. (1978a), *Alginat-Filter zur Konzentrierung von Enterovirus aus Wässergem Milieu-Grenzen der Methode*. Zbl. Bakteriol. Parasitenk. Infections krankh. Hyg., Abt. I. Orig. B **165**, *5—6*, 471—477.
BLOCK J. C., JORET I. C., MORLOT M., FOLIGUET I. M. (1978b), *Persistence of poliovirus 1 during the freezing-thawing of hydroxide sludges from a water treatment plant under laboratory conditions*. Europ. J. appl. Microbiol. Biotechnol., **5**, *4*, 331—340.
BONDARENKO V. I., POPOVICI G. G. (1982), *Sovremenoe sostoianie voprosa o bacterialinom i virusnom zagreaznenii proberejnoi zoni morei*, Ghig. Sanit., *3*, 57—60.
BOYCE D. S., SPROUL O. J., BUCK C. E. (1981), *The effect of bentonite clay on ozone disinfection of bacteria and viruses in water*, Water Res., **15**, *6*, 759—767.
BROWN T. S., MALINA J.F.J., MOORE B.D. (1974), *Virus removal by diatomaceous-earth filtration*. J. amer. Water Works Ass., **66**, *12*. 735—738.
CAJAL N. (1978), *Virusurile şi menţinerea echilibrelor interecosistemice*. În : Abstr. Works of the „Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, 12.
CERKINSKI S. N., LOVŢEVICI E.L., REABCENKO V. A. (1971), *Sanitarnopocazatelnoie znacenie chişecinoi palociki pri razlicinih usloviah obezzarajivania vodi v otnoşenii enterovirusov*, Ghig. Sanit. *3*, 7—10.
CHARBONNEAU P. (1978), *Contribution du laboratoire national de la santé à la surveillance épidémiologique des entérovirûs non poliomyélitiques*, Bull. Acad. Méd., *3*, 209—214.
COOKSON J. T. (1974), *Virus and water supply*. J. Amer. Water Works Assoc., **66**, *12*, 707—711.
COPELOVICI Y., IFTIMOVICI R. (1978), Virusurile ca agenţi poluanţi ai mediului. În : Abstr Works of the „Şt. S. Nicolau" Institute of Virology, Bucharest, 22.

Scanned with OKEN Scanner

COTOR F., AVRAM G., TIRON S., ZAVATE O. (1981), *Incidenţa enterovirusurilor în unele categorii de ape*. Igiena, **30**, *2*, 161—165.

COTOR F., ZAVATE O., FINICHIU M., AVRAM G., IVAN A. (1983), *Contaminarea enterovirală a apei de ştrand în comparaţie cu unii indicatori bacteriologici*, Rev. roum. Med. — Virol., **84**, *4*, 000.

CROVARI P., DE FLORA S., VANNUCI A., BADOLATI G. (1974), *The virological monitoring of water. II. Sea water*. Bol. Ist. Sieroter. Milan, **53**, *4*, 525—532.

DAHLING D. R., SAFFERMAN R. S. (1979), *Survival of enteric viruses under natural conditions in a subarctic river*. Appl. environ. Microbiol., **38**, *6*, 1103—1110.

DMITRIEVA R. A., DOSKINA T. V. (1980), *Metodî videlenia chişacinih i respiratornih virusov iz razlicinah obiectov ocrujainşcei sredî*. Ghig. Sanit., *5*, 40—41.

DROZDOV S. G., KAZANŢEVA V. A. (1977), *O znacimosti rezultatov virusologhicescovo obsedovanie stocinîh vod; sopostavlienie nabora enterovirusov videlinîh iz stocinih vod i iz fekalii viruso vîdelitelei*. Vopr. Virusol., *5*, 597—602.

DROZDOV S. G., KAZANŢEVA V. A. (1981), *Patoghenîie Virusî i problemî okrujaiuscei sredî*. Vestn. Acad. Med. Nauk S.S.S.R., *3*, 85—93.

ENGELBRECHT R. S., WEBER M. I., SALTER B. L., SCHMIDT C. A. (1980), *Comparative inactivation of viruses by chlorine*. Appl. environ. Microbiol., **40**, *2*, 249—256.

EPP CH., METZ H. (1980), *Virologische Untersuchungen an bestraheten Klärschlämmen*. Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg., **171**, *1*, 86—95.

FARRAH S. R., GOYAL S. M., GERBA C. P., CONKLIN R. H., SMITH E. M. (1978), *Comparison between adsorption of poliovirus and rotavirus by aluminium hydroxide and activated sludge flocs*. Appl. environ. Microbiol., **35**, *2*, 360—363.

FARRAH S. R., BITTON G., (1979), *Low molecular weight substitutes for beef extract as elements for polioviruses adsorbed to membrane filtres*. Canad. J. Microbiol., **25**, *9*, 1045—1051.

FARRAH S. R., SCHEUERMAN P. R., BITTON G. (1981), *Urea-lysine method for recovery of enteroviruses from sluge*. Appl. environ. Microbiol., **41**, *2*, 455—458.

FATTAL B., KATZENELSON E., SHUVAL H. I. (1974), *Comparison of methods for isolation of viruses in water*. In symp. : *Virus survival water and wastewater system*, Austin., 19—30.

FATTAL B., KATZENELSON E. (1976), *Evaluation of Gauze pad method to recover viruses from water*, Water Res., **10**, *2*, 1135—1140.

FATTAL B., KATZENELSON E., HOSTOVSKY T., SHUVAL H. I. (1977), Comparison of adsorption-elution methods for concentration and detection of viruses in water, Water Res., **11**, 955—958.

FATTAL B., NISHIMI M. (1977), *Enterovirus types in Israel sewage*, Water Res., **11**, *4*, 393—396.

FEACHEM R., GARELICK H., SLADE J. (1981), *Enteroviruses in the environment*, Trop. Dis. Bull., **78**, *3*, 186—230.

FOLIGUET J. M., DONCŒUR F. (1974), *Elimination des virus au cours du traitement de l'eau préchloration du « bear point »*. Water Res. **8**, *9*, 651—657.

FOLIGUET J. M. et al (1978), *Recent development of virological water research in France, 1978*. Abst. Fourth Int. Congr. Virol., Hague, Workshop 6.

FREEMAN L. (1978), *Keeping the virus at bay*. Water, **20**, 11—13.

GAMBLE D. R. (1979), *Viruses in drinking-water*. Lancet, *8113*, 425—427.

GAUDIN O. G., MELLEY B., CHOMEL J. J., VIAC I. (1976), *Inventaire virologique (coliphage et entérovirus humains) dans une eau de rivière en aval d'une zone urbaine (Saint-Etienne)*. Rev. Epidem. Santé publ. **24**, 423—436.

GERBA C. P., WALLIS C., MELNICK J. L. (1977a), *Application of photodynamic oxidation to the disenfection of tap water, seawater and sewage contaminated with poliovirus*. Photochem. Photobiol., **26**, *5*, 499—504.

GERBA C. P., SMITH E. M., MELNICK J. L. (1977b), *Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments*. Appl. environ. Microbiol., **34**, *2*, 158—163.

GERBA C. P., FARRAH S. R., GOYAL S. M., WALLIS C., MELNICK J. L. (1978), *Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage and seawater*. Appl. environ. Microbiol., **35**, *3*, 540—548.

GERBA C. P., GOYAL S. M., LA BELLE R. L., CECH I., BOGDAN G. F. (1979), *Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters*. Amer. J. publ. Hlth., **69**, *11*, 1116—1119.

GLASS J. S., O'BRIEN R. T. (1980), *Enterovirus and coliphage inactivation during activated sludge treatment*. Water Res., **14**, *7*, 877—882.

GOWDA M.M.N., TRIEFF M. N., STANTON J. G. (1981), *Inactivation of poliovirus by chloramine T*. Appl. environ. Microbiol., **42**, *3*, 469—476.

Scanned with OKEN Scanner

GRIGORIEVA L. V., KORCEAK G. I. (1977), *K metodike konjentrafii virusov v vode.* Ghig. Sanit. *6*, 62–64.

GRINSTEIN S., MELNICK J. L., WALLIS C. (1970), *Virus isolation from sewage and from a stream receiving effluents of sewage treatment plants.* Bull. W.H.O., **42**, *2*, 291–296

GUY M. D., Mc IVER J. D., LEWIS M. J. (1977), *The removal of virus by a pilot treatment plant.* Water Res., 11, *5*, 421–428.

HAJENIAN H. G., BUTLER M. (1980), *Inactivation of virus in municipal effluent by chlorine* J. Hyg., **84**, *1*, 63–69.

HARTEMANN PH., BLOCK I. C., JORET I. C., FOLIGUET I. M. (1981), *Enteroviren in Ab- und Oberflächengewässern.* Hanstechn. Bauphys. Umwelt techn., **102**, *3*, 110–113.

HAWLEY H. B., MORIN D. P., GERAGHTY M. E., TOMKOW J., PHILLIPS C. A. (1973), *Coxsackie virus B epidemical a boys'summer camp. Isolation of virus from swimming water.* J. Amer. med. Assoc., **226**, *1*, 33–36.

HEJKAL T. W., KESWICK B., LA BELLE R. L., GERBA C. P., SANCHEZ Y., DREESMAN G., HAFKIN B., MELNICK J. L. (1982), *Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis.* J. Amer. Water Works Assoc., **74**, *6*, 318–321.

HERMANN I., KOEHN E. (1981), *Virologische Stuhl and Abwasser Untersuchungen in Berlin.* Off. Gesundheitsw., **43**, *7*, 322–325.

HILL W. F., JAKUBOWSKI W., AKIN E. W., CLARKE N. A. (1976), *Detection of virus in water : sensitivity of the tentative standard method for drinking water.* Appl. environ. Microbiol., **31**, *2*, 254–261.

HUGUES B., BOUGIS M. A., PLISSIER M., ANDRÉ M., LAURENT D., PAGLIARDINI A. (1979a), *Evaluation de la contamination virale marine après rejet d'un effluent par un émissaire en mer.* Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg., Abt. Org., **169**, *3–4*, 253–264.

HUGUES B., PLISSIER M., ANDRÉ M., PAGLIARDINI A., LAURENT D. (1979b), *Evaluation de la charge virale dans les eaux d'une station d'épuration biologique au moyen de deux méthodes de concentration de virus par adsorption-élution sur poudrede verre ou sur microfibre de verre.* Water. Res., **13**, *12*, 1117–1123.

HUGUES B., BOURON Y., PLISSIER M., ANDRÉ M. (1980), *Influence de différents modes de prélèvement sur l'estimation du rendement bactériologique et virologique d'une station d'épuration bilogique.* Zbl. Bakt., **171**, *6*, 488–496.

HUGUES B., LEFÉVRE J. R., PLISSIER M., CINI A. (1981), *Verteilung der viralen und bakteriellen Dichte in Meerwasser in der Näha einer Einleitung auf bereiteter privater Abwässer an der Küste.* Zbl. Bakt. Hyg., **173**, *6*, 509–516.

HURST C. I., FARRAH S. R., GERBA C. P., MELNICK J. L. (1978), *Development of quantitative methods for the detection of enteroviruses in sewage sludges during activation and following land disposal.* Appl. environ. Microbiol., **36**, *1*, 81–89.

IRVING L. G., SMITH F. A. (1981), *One-year survey of enteroviruses, adenoviruses and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant.* Appl. environ. Microbiol., **41**, *1*, 51–59.

JENSEN H.; THOMAS K., SHARP D. G. (1980), *Instinction of Consackie-viruses B3 and B5 in water by chlorine.* Appl. environ. Microbiol., **40**, *3*, 764–767.

JESSSEN H. J., COTTSCHALT N. (1982), *Hygienische und technische Verhältnisse in den Breliner Hallenbädern 1979. Ein Situationsbericht.* Z. Hyg., **82**, *2*, 79–82.

JORET I. V., BLOCK Y. C., LUCENA-GUTIERREZ F., SCHWARTZBROD L., HUGUES B., PLISSIER M. (1980), *Virus concentration from secondary wastewater : comparative study between epoxy fiberglass and glass powder adsorbents.* Eur. J. appl. Microbiol. Biotechnol., **10**, *3*, 245–252.

JORET J. C., BLOCK J. C. (1981), *Survie de virus entériques adsorbés sur microfibre de verre au cours d'un transport postal.* Canad. J. Microbiol., **27**, *2*, 94–105.

KALTER S. S., MILLSTEIN C. H. (1974), *Efficacy of methods for the detection of viruses in treated und untreated sewage.* In Symp. : *Virus Survival Water and Wastewater Systems*, Austin, pp. 33–34.

KAPUCINSKI R. B., MITCHELL R. (1980), *Processus controlling virus inactivation in coastal waters.* Water Res., **14**, *4*, 363–371.

KATZENELSON E., CLETTER B., SHUVAL H. I. (1974), *Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use of ozone* J. Amer. Water Works Assoc., **66**, *12*, 725–729.

KATZENELSON E., BIEDERMANN N. (1976), *Disinfection of viruses in sewage by ozone.* Water Res., **10**, *7*, 629–631.

KATZENELSON E. (1977), *Concentration and identification of viruses from sea water.* Rev. int. Oceanogr. Med., **48**, *2*, 9–16.

Scanned with OKEN Scanner

YORK W. D., DREWAY W. A. (1974), *Virus removal by chemical coagulation.* J. Amer. Water Works Assoc., **66**, *12*, 711–720.
YOUNG D. C., JOHNSON I. D., SHARP D. G. (1977), *The complex reaction kinetics of ECHO-1 virus with chlorine in water.* Proc. Soc. exp. Biol. Med., **156**, *3*, 496–499.
ZAMFIR GH. (1979), *Efectele unor poluanţi şi prevenirea lor.*, Ed. Academiei, pp. 77–104.
ZAVATE O., COTOR F., IVAN A., TIRON S., AVRAM G. (1980), *Investigation on the circulation of enteroviruses in a children community*, Rev. roum. Med. – Virol., **31**, *4*, 289–293.
ZDRAZILEK J., JADRNICKOVA N., JANDASEK L., UVIZL M., VALIHRACH I. (1974), *Presence of poliovirus and other enteroviruses in sewage.* Bull. W.H.O., **50**, *6*, 562–563.
ZOTOVA V. I., MÎSLEAEVA L. A. (1976), *K voprosu o kolicestvenom opredelenii enterovirusov iz vod raznoi stepeni zagriaznenia.* Ghig. Sanit., *3*, 63–65.
ZOTOVA V. I., DOSKINA T.V. (1977), *Vlianie obrabotki ultrazvukom na proţes hlorirovania vodoprovadnoi vodî otnosenii virusov.* Ghig. Sanit., **9**, 99–100.

5.2. ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE ÎN SOL

5.2.1. TRANSMITEREA ENTEROVIRUSURILOR PRIN SOL

Dintre elementele mediului ambiant, solul reprezintă incontestabil unul dintre receptorii principali ai tuturor eliminărilor biologice, inclusiv ai celor enterovirale, chiar dacă acest fapt nu poate fi totdeauna demonstrat prin examene de laborator.

Solul poate fi poluat prin materii fecale de către excretorii de enterovirusuri fie direct, fie indirect prin apele uzate în care enterovirusurile se găsesc în cantităţi considerabile (fig. 5.8).

Contaminarea directă a solului, în prezent accidentală, a fost posibilă în trecut, secole de-a rîndul, prin utilizarea materiilor fecale de vidanjare ca material de îngrăşămînt în numeroase zone ale globului.

În perioada actuală, contaminarea solului cu enterovirusuri se produce aproape exclusiv indirect, prin intermediul apelor uzate deversate pe sol ca atare sau sub formă de nămoluri provenite din staţiile de tratare, precum şi cu ocazia diferitelor procedee de irigare.

Deversarea apelor uzate netratate pe sol este practicată în unele ţări cu scopul de a reduce încărcătura poluantă a apelor de suprafaţă (rîuri şi lacuri), deja puternic contaminate de la alte surse. Cel mai frecvent, însă, poluarea solului prin intermediul apelor uzate se face cu ocazia împrăştierii nămolurilor provenite din instalaţiile moderne de tratare a apelor uzate, această operaţie fiind considerată ca mijlocul cel mai puţin costisitor de îndepărtare a rezidiilor lichide (W.H.O., 1979). În ceea ce priveşte irigaţiile în scop agricol, ele suscită un interes din ce în ce mai mare în lumea întreagă, reutilizarea apelor uzate devenind o măsură inevitabilă în condiţiile actuale în care sporirea populaţiei duce la epuizarea surselor existente de apă.

Infectarea omului receptiv prin intermediul solului se poate produce prin mai multe modalităţi (fig. 5.8):

– direct cu ocazia activităţii, la muncitorii agricoli şi la cei în contact cu aceştia;

– prin consum de produse vegetale cultivate pe solurile irigate, aspect ce va fi detaliat şi în capitolul 5.3;

– prin insecte şi animale vectoare din zonă;

– prin consum de apă potabilă contaminată în straturile freatice ca urmare a spălării solului după ploi sau topirea zăpezilor;

Scanned with OKEN Scanner

— prin aerosoli, în cazul în care irigarea se face prin pulverizarea apelor uzate, muncitorii agricoli, locuitorii din zonă şi trecătorii fiind expuşi la infectarea pe cale respiratorie, aspect ce va fi reluat în capitolul 5.4.

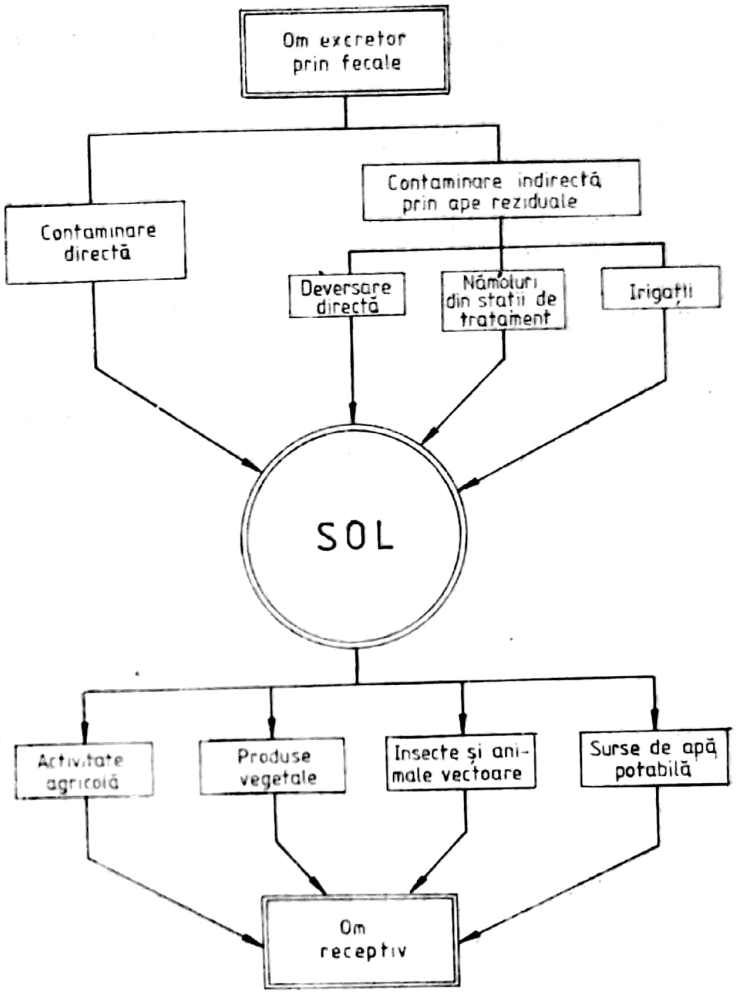


Fig. 5.8 — Modalităţi de transmitere a enterovirusurilor prin sol.

5.2.2. PREZENŢA ENTEROVIRUSURILOR ÎN SOL

Dacă poluarea bacteriană şi parazitară a solului este astăzi bine argumentată prin examene de laborator, demonstrarea poluării virale a întîmpinat şi întîmpină încă serioase dificultăţi de ordin tehnic şi metodologic, ceea ce a făcut ca informaţiile privind acest capitol să fie fragmentate şi slab reprezentate în literatura de specialitate.

Aşa cum am arătat, în fecalele umane concentraţiile de enterovirusuri pot atinge valori de 10^5—10^8 UFP/1 g. Eliminate în apele fecalomenajere, enterovirusurile pot fi regăsite în nămolurile primare brute în concentraţii variind între 1 şi 100 UFP/ml sau 10 şi 1 000 DCP_{50}/ml. Chiar nămolurile bine digerate rămîn o sursă potenţială de contaminare. În solurile irigate cu ape uzate poliovirusurile au fost descoperite după 96 de zile iarna şi după 11 zile vara de la stropire. Melnick şi colab. (1978) au arătat că virusurile adsorbite pe particule de sol nu sînt inactivate ci pot rămîne viabile mai multe luni fiind eliberate în condiţii propice. La o staţie de irigare dintr-un centru urban din S.U.A. s-a constatat că

Scanned with OKEN Scanner

ploile torenţiale au provocat schimbarea factorilor care determinau adsorbţia şi desorbţia virusurilor ducînd la eliberarea lor în apa subterană. În acest studiu s-a constatat că virusurile au migrat prin sol şi au fost găsite la 3—6 m de la suprafaţă.

5.2.3. METODE DE EVIDENŢIERE A ENTEROVIRUSURILOR ÎN SOL

Metodele de evidenţiere a enterovirusurilor în sol sînt, în prezent, în stadiul experimentărilor de laborator şi mai puţin în stadiul de aplicare în teren. Puţinele investigaţii în această direcţie au recurs la metodologia de lucru a analizelor microbiologice ale solului, destul de avansate, care constau din următoarele etape: alegerea obiectivelor, recoltarea probelor de sol, concentrarea particulelor virale şi izolarea şi identificarea virusurilor prin inocularea pe culturi celulare sau animale de laborator. Redăm în continuare o schemă de lucru descrisă de Nestor (1973), considerată de noi ca fiind posibilă de aplicat în condiţiile laboratoarelor noastre:

a) *Alegerea obiectivelor*. Recoltarea probelor de sol pentru examene virusologice se va face din puncte de poluare maximă sau din puncte care necesită o strictă supraveghere sanitaro-antiepidemică:

— terenuri din perimetrele de protecţie a instalaţiilor de captare, tratare şi depozitare a surselor de apă potabilă;

— terenuri agricole irigate direct sau fertilizate cu nămoluri provenite din instalaţiile de epurare a apelor uzate;

— terenuri transformate în rampe de gunoi orăşenesc sau destinate depozitării neorganizate a acestora şi care se află în vecinătatea zonelor locuite;

— terenuri şi curţi din jurul unităţilor spitaliceşti, a instituţiilor de copii, cazărmilor, şantierelor, unităţilor de alimentaţie publică etc.;

— terenuri destinate ştrandurilor, plajelor şi terenurilor de joc pentru copii.

În stadiul actual, cel mai adesea alegerea obiectivului este determinată de necesităţi de ordin epidemiologic şi mai rar de cele de ordin preventiv datorită dificultăţilor tehnice de evidenţiere a virusurilor în acest element al mediului ambiant.

b) *Recoltarea probelor*. Caracteristicile locale topografice, geologice, modul de folosire a terenului, prezenţa vegetaţiei, caracterele climatice şi data recoltării vor fi menţionate într-o fişă ce va însoţi proba. În vederea respectării unei proporţionalităţi între suprafaţa terenului de cercetat şi numărul probelor prelevate se recomandă ca pentru o suprafaţă de 1 000 de m² de teren să se recolteze probe de pe două parcele reprezentative de $5 \times 5 = 25$ m². Toate manoperele de recoltare a probelor se efectuează respectînd regulile de asepsie recomandate pentru recoltarea probelor bacteriologice din sol sau din apă.

Recoltările se fac din stratul superficial al solului pînă la o adîncime de 20 cm, iar de pe fiecare parcelă se ridică 5 probe de cîte 200—300 g din puncte dispuse simetric: fie o probă la mijloc şi patru pe laturile sau colţurile patratului parcelei, fie 5 probe dispuse pe una din diagonalele parcelei. Cele 5 probe se amestecă între ele constituind o probă medie din care se preiau 200 g de sol care se pun într-un vas de sticlă sau într-o pungă de plastic sterile. Pentru probele de adîncime, în cazul cînd se urmăresc de exemplu infiltrările apelor fecalomenajere în stratul freatic de unde se alimentează fîntînile din zona respectivă, se recomandă diverse modele

Scanned with OKEN Scanner

de sonde cu care se pot recolta probe de sol pînă la o adîncime de 3 metri. Transportul probelor la laborator se face în lăzi izoterme cu gheață, iar pînă la efectuarea analizelor ele pot fi stocate la rece. În vederea punerii în lucru, din probele respective vor fi eliminate elementele grosiere (pietrele, bucățile de lemn, resturile vegetale etc). Apoi proba se fărîmițează și se cerne prin sită sterilă cu ochiuri de 3 mm, luîndu-se măsuri de prevenire a împrăștierii particulelor de sol prin laborator.

c) *Pregătirea suspensiei de sol pentru inoculare. Eluția.* În mod curent, pentru analiză se preia o cantitate de 10 g de sol din proba medie. Pentru obținerea suspensiei se recomandă folosirea a 20—100 ml ser fiziologic sau bulion de carne 1%, care permit eluția enterovirusurilor de pe particulele de sol. După corectarea pH-ului, suspensia se pune într-un balon de 100 ml, se agită bine iar apoi se centrifughează la 2 000 — 2 500 t/m timp de 15 minute și/sau se filtrează prin hîrtie de filtru pînă la obținerea unui lichid limpede.

d) *Concentrarea* probelor se poate realiza prin adsobție pe membrane de nitrat de celuloză și deshidratare cu polietilenglicol (Wellings și colab., 1975 a; b), prin rășini schimbătoare de ioni sau prin tratare cu levură de bere după o metodă similară cu cea utilizată pentru apă (Nestor, 1973). Înainte de inoculare pe gazde de laborator, probele de sol vor fi tratate cu antibiotice (penicilină + streptomicină cîte 1 000 U) și micostatin (500 U). Apoi filtratul va fi păstrat pînă la inoculare la —20°C.

e) *Inocularea* pe culturi celulare sau pe șoarecele sugar, după tehnicile uzuale, are ca scop izolarea enterovirusurilor permițînd determinarea calitativă a poluării virale a solului. Determinările cantitative se realizează prin numărarea UFP pe culturi celulare la 10 g de probă de sol, din care se scade greutatea umidității solului obținută prin uscarea unei probe de sol martor. Apoi se face raportarea numărului de UFP înregistrat la 1 g de sol uscat.

Alte metode descrise mai recent în literatura de specialitate recomandă pentru eluție ser de bou 5% cu mediu 199 (Dmitreva și Doskina, 1980) sau cazeină, care crește proporția izolărilor la 60% în comparație cu cea de 41% obținută cu EDTA și 37% cu extract de carne (Charles și colab., 1979). Hurst și Gerba (1979), experimentînd metodele cantitative de determinare a enterovirusurilor pe terenurile irigate cu ape uzate, recomandă pentru eluție amestecarea probei de sol cu 4 volume egale de tampon glicină (pH 11,5) conținînd EDTA. După centrifugarea suspensiei, virusurile din lichidul supernatant se concentrau cu ajutorul $AlCl_3$ 0,001 M la pH 3,5. A doua centrifugare era urmată de filtrare prin filtre de fibre de sticlă și eluarea virusurilor de pe aceste filtre. Această metodă a permis autorilor să atingă un indice de izolare de aproximativ 70%.

În încheiere, trebuie de menționat, încă odată, că în stadiul actual dificultățile metodologice și tehnice în izolarea enterovirsurilor din sol nu sînt depășite, astfel încît metodele de cercetare virusologică a solului rămîn în fază de experimentare de laborator sau de teren fără posibilități momentane de a fi introduse în practica unităților sanitaro-antiepidemice din teren.

5.2.4. STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND SUPRAVIEȚUIREA ENTEROVIRUSURILOR ÎN SOL

Pot fi diferențiate două categorii de studii experimentale care au ca scop cunoașterea duratei de supraviețuire și posibilitățile de inactivare a enterovirusurilor în sol: studii de laborator în care probele de sol sînt contami-

Scanned with OKEN Scanner

nate artificial în diferite condiţii de experimentare şi studii de teren în care contaminarea artificială a solului se face în natură cu urmărirea riguroasă a parametrilor vizaţi. Aceste studii experimentale constituie, în stadiul actual, singurul instrument de obţinere a informaţiilor privind posibilităţile de utilizare a apelor uzate şi a nămolurilor în scop agricol (Bitton şi colab., 1979).

În ambele categorii de studii au fost obţinute date preţioase privind influenţa structurii geologice a solului, a variaţiilor de umiditate, de temperatură şi de pH, a gradului de încărcare microbiană etc. asupra duratei de supravieţuire a enterovirusurilor.

a) *Structura geologică a solului* influenţează supravieţuirea sau inactivarea enterovirusurilor în primul rînd prin capacitatea sa de adsorbţie. În această privinţă au fost efectuate numeroase studii care au vizat pe de o parte cunoaşterea solurilor celor mai propice pentru a fi utilizate în epurarea virusologică a apelor uzate şi, pe de altă parte, cunoaşterea mecanismelor de adsorbţie a virusurilor pe diferite feluri de sol.

Experimental s-a constatat că durata de supravieţuire a enterovirusurilor a variat în raport cu natura solului şi cu tipul antigenic de enterovirus între 8 săptămîni pentru pămîntul de grădinărit (Mazur şi colab., 1974) şi 23—24 săptămîni pentru solul argilos şi nămol (Gerba şi colab., 1975; Damgaar-Larsen şi colab., 1977). În tabelul 5.7 sînt redate cîteva din cercetările mai recente privind capacitatea de adsorbţie a enterovirusurilor pe diferite soluri.

Tabelul 5.7

Capacitatea de adsorbţie a enterovirusurilor în raport cu structura geologică a solului

Autor	Anul	Enterovirus	Tipurile de sol studiate în ordinea descrescîndă a capacităţii lor de adsorbţie
Mazur şi colab.	1974	Poliovirus	Pămînt de grădinărit, nisip
Gerba şi colab.	1975	Enterovirusuri	Argilos, nisipos gras
Moore şi colab.	1979	Poliovirus tip 2	Argilos mineralizat, nămol, argilă nisipoasă grasă, nisip, îngrăşăminte de grajd
Sobsey şi colab.	1980	Poliovrus tip 1	Argilos, nisip, materii organice
Dmitreva şi Doskina	1980	Enterovirusuri	Podzol, sol cenuşiu, cernoziom

Mazur şi colab. (1974) şi Rehse (1977) au evidenţiat relaţia directă dintre dimensiunea particulelor componente ale solului şi capacitatea sa de adsorbţie. S-a arătat că eficienţa filtrantă a solului depinde de gradul de dispersiune a particulelor. Adsorbţia virusurilor se realizează rapid în primele 15 minute de contact. Scheuerman şi colab. (1979) au studiat rolul substanţelor humoase prezente în solurile nisipoase organice şi în sedimentele dintr-o staţie de epurare a apelor reziduale. Luînd drept indi-

Scanned with OKEN Scanner

cator poliovirusul tip 1, autorii au demonstrat că substanţele humoase solubile în apă au scăzut simţitor capacitatea de adsorbţie a solului în timp ce în absenţa acestor substanţe reţinerea enterovirusurilor a ajuns la 80 % şi chiar la 100 %, de unde deducţia practică că solurile organice nu sînt potrivite pentru epurarea enterovirusurilor din apele uzate.

Fuhs şi colab. (1979) au relevat, la rîndul lor, raportul dintre prezenţa în sol a substanţelor organice şi minerale şi capacitatea de adsorbţie a virusurilor, iar Vilker şi Burge (1980) au recomandat un model special de transfer pentru testarea legăturilor de adsorbţie între virusuri şi particulele solurilor de diferite structuri şi mineralizări. Modelul este adaptabil pentru caracterizarea mişcării virusurilor în sol cînd parametrul izotermiei de echilibru K_L, Q şi coeficientul de masă de transfer sînt cunoscute, fiind utilizat pentru evaluarea nivelului de adsorbţie în serii şi sisteme de coloane filtrante.

Schaub şi colab. (1980) au studiat eficienţa epurării virusurilor (poliovirus şi bacteriofag f_2 marcaţi) prin metoda de deversare a apelor de canal, tratate, pe suprafaţa unui sol glomerular fin de argilă grasă nisipoasă acoperit cu pămînt ierbat şi în pantă. S-a constatat că virusurile au fost îndepărtate în proporţii de 30—60 % pe parcele irigate şi de 68—85 % pe cele în pantă, pătrunderea lor în adîncimea solului fiind neînsemnată. Lance şi Gerba (1979, 1980) au studiat răspîndirea, adsorbţia şi supravieţuirea enterovirusurilor în sol în condiţii de laborator cu ajutorul coloanelor umplute şi în condiţii de teren. Adsorbţia virusurilor avea loc în majoritate în stratul superficial al solului. Migrarea virusurilor în adîncime nu depăşea 250 cm, ceea ce reflectă că ele nu pătrund în straturile freatice. Viteza optimă de circulaţie a apei uzate prin sol a fost cea de sub 120 cm/zi. Diferite aspecte ale migrării enterovirusurilor în sol au mai fost studiate de Funderburg şi colab. (1979), Landry şi colab. (1979 a, b) şi Duboise şi colab. (1979).

b) *Umiditatea* prezintă o deosebită importanţă în durata de supravieţuire a enterovirusurilor în sol. Experimentările efectuate cu poliovirus şi cu virus ECHO tip 7 şi 9 au arătat că în solul uscat, la aer, ele au supravieţuit numai 12—25 de zile, pe cînd în solul cu umiditate de 10—42 % peste 60 de zile. Nestor (1973) a confirmat la rîndul său acest fenomen pentru virusul Coxsackie A4 care a supravieţuit 15—30 de zile în pămînt uscat şi 77—99 de zile în pămînt cu o umiditate de 20—30 %.

Yeager şi O'Brien (1979a, b) au urmărit inactivarea poliovirusului tip 1 şi Coxsackie B1, marcate radioactiv, în diferite condiţii de structură a solului, de umiditate, temperatură etc. S-a remarcat că inactivarea virusurilor se realiza mai rapid în solul uscat, indiferent de temperatură şi de gradul de poluare a lichidului folosit pentru suspensie. Modificările structurale ale virusului în condiţii de uscare constau din disocierea genomului viral şi degradarea ARN, la care se asociază probabil şi alte mecanisme. Autorii consideră că aceste date pledează pentru folosirea procedeelor de uscare a nămolurilor provenite din staţiile de tratare a apelor uzate destinate reutilizării în scop agricol, în vederea reducerii pericolului de poluare enterovirală a solului.

c) *Temperatura.* Se cunoaşte că la o temperatură ambiantă de 20—25°C enterovirusurile supravieţuiesc doar cîteva zile, în timp ce la temperaturi scăzute ele pot rezista mai multe luni sau chiar ani. În experienţele cu sol s-a constatat că durata supravieţuirii enterovirusurilor (poliovirus tip 1, virusurile ECHO tip 7 şi 9 şi Coxsackie tip B3) a fost

Scanned with OKEN Scanner

în general mai prelungită în solul menţinut la 3—10°C decît la 18—23°C, ceea ce înseamnă că în condiţiile naturale enterovirusurile rezistă în sol un timp mai îndelungat în sezon rece în comparaţie cu cel cald, fapt important din punct de vedere epidemiologic (Lefler şi Kott, 1974a).

d) *pH-ul.* Experimentările au arătat că în solul cu un pH de 7,2 virusurile au rezistat pînă la 5 săptămîni, în cel cu pH 8,5 aproximativ 3—4 săptămîni, pe cînd în solurile cu pH de 3,5 numai 24 de ore. În general, un pH alcalin permite supravieţuirea enterovirusurilor în sol, iar pH-ul acid este defavorabil (Fuhs şi colab., 1979; Lefler şi Kott, 1974b).

Cercetările efectuate de Burge şi Enkiri (1978), asupra capacităţii inegale de adsorbţie a diferitelor categorii de soluri, au arătat că solurile macroglomerulare şi cu un pH prea crescut se caracterizau prin incapacitatea de adsorbţie, pe cînd alte patru categorii de soluri studiate, avînd pH 6,0 — 7,2, adsorbeau bacteriofagul luat ca indicator în concentraţii de 2×10^3 şi 2×10^7 UFP.

e) *Flora microbiană.* S-a demonstrat că poliovirusul tip 1 a rezistat 30—40 de zile în sol steril şi numai 16 zile în sol natural. Experienţele lui Lefler şi Kott (1974a, b) asupra adsorbţiei şi supravieţuirii poliovirusului tip 1 în coloană de nisip au arătat că atunci cînd suspensia de virus era amestecată cu apă de robinet sterilă durata de supravieţuire a fost de 61—91 de zile, în timp ce în suspensii amestecate cu apă reziduală supravieţuirea acestuia nu depăşea 7 zile, ceea ce reflectă că în prezenţa florei microbiene se produce o dispariţie mai rapidă a poliovirusului din nisip.

Raporturile dintre enterovirusurile din sol şi flora microbiană ar merita să fie aprofundate, precum şi relaţiile lor cu fungi şi micete, care sînt capabile să producă toxine sau alte substanţe cu acţiune inactivantă asupra virusurilor. Este posibil ca procesele de autoepurare naturală solului, prin care se realizează descompunerea materiilor organice şi distrugerea florei microbiene, să influenţeze şi inactivarea virusurilor.

f) *Tipurile antigenice de enterovirusuri* se comportă diferit în ceea ce priveşte durata de supravieţuire în sol, avînd caracteristici proprii care au fost demonstrate experimental. După Melnick şi colab. (1978) poliovirusurile rezistă mai puţin în sol în comparaţie cu enterovirusurile nepoliomielitice. Goyal şi Gerba (1979) şi Gerba şi colab. (1980) au evidenţiat diferenţe marcate între rezistenţa diferitelor tipuri antigenice de enterovirusuri în sol. De exemplu, virusurile ECHO tip 1 şi 7 şi Coxsackie B3 s-au dovedit mai rezistente decît poliovirusul tip 1 şi ECHO tip 9. În acest context, datele din literatura de specialitate privind durata de supravieţuire a enterovirusurilor în sol nu reprezintă obligatoriu valorile maxime, niciunul dintre enterovirusuri neputînd fi luat fără rezerve ca indicator de poluare virală.

Studiile experimentale au permis, în paralel, descifrarea într-o bună măsură a mecanismului de îndepărtare a enterovirusurilor în sol (Funderburg şi colab., 1981). El constă fie din inactivarea reală a enterovirusurilor fie, mai curînd, dintr-un fenomen complex în care virusurile se adsorb pe particulele coloidale organice şi minerale din sol, dar nu se inactivează (Damgaar-Larsen şi colab., 1977; Lefler şi Kott, 1974a, b).

Folosind ca eluent tamponul Tris, s-a reuşit să se recupereze 62—68% din poliovirusul tip 1 adsorbit pe nisip uscat iar la eluţii repetate aproape toată cantitatea de virus. Acelaşi aspect a fost pus în evidenţă şi în studiile experimentale de teren care au permis, în plus, şi o serie de observaţii asupra migrării de enterovirusuri în sol. Porozitatea şi capilaritatea solului

Scanned with OKEN Scanner

permit infiltrarea apelor meteorice încărcate cu materii organice de la suprafață spre straturile de apă freatică. Poluarea enterovirală a solului prin migrarea în suprafață și în adîncime a fost confirmată în ultimele decenii printr-o serie de investigații de teren dovedindu-se importanța lor epidemiologică. Astfel, Duboise și colab. (1974) au demonstrat că poliovirusul tip 1, adsorbit pe un sol natural nisipos de pădure, a putut fi pus în evidență în eluent chiar peste 4 zile. Wellings și colab. (1975a, b), studiind supraviețuirea virusurilor Coxsakie în solul irigat cu ape reziduale, le-au reizolat dintr-o fîntînă aflată în vecinătate la circa 3 metri adîncime, demonstrînd deplasarea laterală și verticală a virusului în sol. Virusul a fost evidențiat în apa de fîntînă timp de 28 de zile. Există deci posibilitatea ca și în condiții naturale să se producă poluarea apei freatice, în special după precipitații abundente (Landry și colab., 1979 a, b).

Migrarea virusurilor în sol mai poate avea ca rezultat adsorbția lor naturală pe rădăcinile plantelor care prin atracția umidității determină acumularea particulelor virale în jurul acestor rădăcini și chiar pătrunderea lor în interiorul plantelor. De exemplu, Tierney și colab. (1977) au găsit virusuri pe suprafața plantelor după 23 de zile de la încetarea irigației. Cercetări similare au fost efectuate și de alți cercetători, subiectul urmînd a fi reluat în capitolul 5.3.

În concluzie, ca urmare a studiilor experimentale s-a precizat că factorii care influențează supraviețuirea virusurilor intestinale în sol sînt reprezentați de pH, concentrație ionică, umiditate, temperatură, expunere la lumina solară și prezența materiilor organice la care se adaugă forța tensiunii superficiale, structura geologică și porozitatea solului și procesele de oxidoreducere ce au loc în prezența florei microbiene din sol. În general, s-a remarcat că enterovirusurile sînt sensibile la acțiunea oxidanților și se adaptează bine la agenți reductori. În condiții experimentale, virusurile sînt ușor adsorbite pe particule de sol dar rămîn tot atît de infecțioase pentru om ca și virusurile libere. În interpretarea rezultatelor experimentale se va ține seama că, în unele situații, rezultatele experimentale din laborator nu au fost concordante cu cele de teren, ceea ce impune o deosebită precauție în extrapolarea în natură a datelor obținute.

5.2.5. ENTEROVIRUSURILE ÎN REZIDUURI SOLIDE

Reziduurile solide provin în cantități considerabile din centrele urbane fiind constituite din gunoaie menajere, resturi alimentare, deșeuri industriale, gunoi de stradă și gunoi de grajd. Ele se evacuează în afară de zona locuită, la distanțe nu întotdeauna suficiente pentru a fi inofensive și se depozitează fie organizat pe rampe sau platforme de gunoi, special amenajate, fie mai frecvent în mod neorganizat prin descărcarea la întîmplare pe un anume teren destinat acestui scop.

În ambele situații, depozitele de gunoaie, datorită florei microbiene și virale patogene pentru om, prezintă un pericol potențial permanent, contaminarea putînd avea loc pe cale aeriană, prin uscarea și transportarea prafului cu curenți de aer, pe cale digestivă prin consum de apă provenită din straturile freatice contaminate ca urmare a infiltrațiilor prin sol, prin contact direct în timpul descărcărilor și prin insecte și animale rozătoare. Date privind izolarea enterovirusurilor din reziduuri solide au apărut relativ rar în literatura de specialitate.

Scanned with OKEN Scanner

Ca metodologie de punere în evidenţă a enterovirusurilor în reziduuri solide — aplicată în special în cercetări experimentale — se folosesc sistemele de lizimetre. Lizimetrele sînt instalaţii pedologice care servesc pentru colectarea şi măsurarea cantităţii de ape meteorice care se infiltrează în sol. Aceste instalaţii au fost adaptate pentru solubilizarea probelor de gunoi în amestecul lor natural şi obţinerea unora extracţii apoase în scopul concentrării şi izolării enterovirusurilor.

Lizimetrul utilizat de Sobsey şi colab. (1975) este construit dintr-un tub vertical de plexiglas de aproximativ 1,5 metri lungime şi 15 cm diametru. Fundul acestui tub prezintă 14 orificii de drenare şi o sită de oţel inoxidabil pe care este depus un strat de pietriş mărunt de circa 7 cm grosime. Tubul căptuşit cu un strat termoizolator este montat pe un schelet metalic iar sub placa suportului este fixată o pîlnie de 15 cm diametru pentru colectarea scurgerilor din coloană. Pentru măsurarea temperaturii interioare şi a celei din mediul ambiant, lizimetrul este dotat cu termocupluri.

Prepararea probei de gunoi pentru experimentare s-a efectuat dintr-un amestec avînd componentele prevăzute în tabelul 5.8, în proporţiile apropiate de cele constatate în gunoaiele depuse pe rampele unui centru urban din S.U.A.

Tabelul 5.8

Componentele unui amestec de gunoi preparat în vederea examenelor virusologice
(Sobsey şi colab., 1975)

Componente	Proporţia în greutate (%)
Cutii din carton presat	27,2
Hîrtie de ziar, reviste	18,8
Resturi alimentare	7,8
Sticlă	7,3
Resturi de textile	6,5
Metale (bidoane, cutii)	6,5
Maculatură (corespondenţă)	3,1
Lemne (surcele, bucăţi)	2,1
Hîrtie ambalaje	1,3
Material plastic	0,8
Cîrpe (bumbac)	0,8
Praf din aspiratoare	0,8
Deşeuri de cauciuc	0,4
Deşeuri de piele	0,4
Apă adăugată la acest amestec	16,2

Componentele gunoiului au fost fărîmiţate, reduse la dimensiuni cubice mici apoi combinate prin amestec manual. Amestecul astfel pregătit, în greutate de circa 70 kg, a fost introdus îndesat în două lizimetre formînd cîte o coloană de 90 cm. Conţinutul a fost saturat cu apă adăugîndu-se circa 4 litri de apă la fiecare lizimetru şi menţinîndu-se capacitatea la acelaşi nivel în tot timpul experimentului prin adăugarea de apă distilată. Colectarea probelor în vederea examenelor virusologice s-a efectuat de trei ori pe săptămînă.

Redăm în continuare fazele de prelucrare a probelor efectuate de Sobsey şi colab. (1974), în vederea inocularii pe gazde de laborator :

Scanned with OKEN Scanner

— adăugarea la probă a lichidului saturat de EDTA pînă la concentraţia finală de 0,1 M;

— filtrarea probei prin filtre decantoare cu textură de orlon sau de acetat, prelucrate cu Tween-80;

— prelucrarea probelor cu răşină de anionit (A—540) în proporţie de 1 : 2;

— adăugarea la probă a soluţiei de $MgCl_2$ pînă la concentraţia finală de 0,02M pentru neutralizarea resturilor de EDTA;

— adăugarea soluţiei de $AlCl_3$ pînă la concentraţia finală de 0,0005 M şi aducerea pH-ului pînă la 3,5 pentru stimularea adsorbţiei virusurilor pe filtre;

— filtrarea probelor prin filtre de sticlă;

— eluţia enterovirusurilor de pe filtre cu cantităţi reduse de glicină tamponată, pH 11,5;

— adăugarea la eluatul obţinut a soluţiei izotonice cu scopul de a aduce pH-ul la 7,5. Urmează inocularea pe culturi celulare.

Cu această metodă autorii au realizat experimental o concentrare de 100 de ori a poliovirusurilor iar izolarea a fost pozitivă într-o proporţie de 37% din totalul probelor analizate.

Engelbrecht şi colab. (1974) au studiat prin metode similare procesele biologice care au loc în suspensiile din gunoi. Au fost determinate caracteristicile chimice şi fizice ale părţilor solubilizate şi microflora indicatoare în dinamica procesului de maturaţie. Numărul de germeni coliformi scădea pe măsura avansării procesului de maturaţie. Experimental s-a introdus în probele de gunoi odată cu apa şi suspensia de poliovirus şi s-a urmărit acţiunea inactivantă a proceselor de maturaţie a gunoaielor asupra acestuia. S-a constatat că în a 36-zi, concentraţia poliovirusului a scăzut la 38%, în a 47-a zi la 23% şi în a 76-a zi la 0,1%. S-a stabilit deci că procesele biologice prin care trec reziduurile solide duc la scăderea numărului de enterovirusuri, însă mecanismele de inactivare necesită încă a fi studiate. La concluzii similare au ajuns şi Sobsey şi colab. (1975) care au urmărit experimental durata de supravieţuire a poliovirusului tip 1 şi a virusului ECHO tip 7 în două sisteme de lizimetre cu gunoaie reprezentînd condiţii similare cu cele din rampele organizate. Determinări repetate timp de patru luni nu au dus la detectarea enterovirusurilor nici în suspensiile din gunoaiele lizimetrelor şi nici în resturile de pe pereţii acestor instalaţii. S-a remarcat că adsorbţia virusurilor de pe diferite categorii de reziduuri solide a fost mai activă în prezenţa sărurilor similare cu cele anorganice care participă la solubilizarea naturală a acestor gunoaie.

Supravieţuirea virusurilor în sisteme de levigare a reziduurilor solide a fost urmărită în experimente de Cooper şi colab. (1974, 1975), la nivelul unor rampe organizate de gunoaie şi a unor depozite simple. S-a introdus suspensia de poliovirus şi s-au făcut determinări periodice timp de 20 de săptămîni în vederea detectării enterovirusurilor din extrasele de reziduuri. Caracterul sporadic al izolărilor în aceste suspensii a fost explicat prin repartiţia inegală a virusului datorită pătrunderii neuniforme a apei în masa reziduurilor.

În încheiere, cercetările privind prezenţa şi posibilităţile de inactivare a enterovirusurilor în sol rămîn încă de mare actualitate şi de un interes deosebit pentru evitarea poluării terenurilor utilizate pentru deversarea apelor uzate ca atare sau a nămolurilor, precum şi a celor irigate în scop agricol. În ceea ce priveşte prezenţa şi inactivarea enterovirusurilor în gunoaiele din diversele sisteme de depozitare şi tratare a reziduurilor

Scanned with OKEN Scanner

solide evacuate din centrele populate, ele prezintă deosebite dificultăţi de ordin tehnic şi metodologic a căror depăşire nu se poate realiza curînd cu tot potenţialul epidemiologic evident al acestor obiective. Se impun măsuri de protecţie corespunzătoare în vederea întreruperii căilor de transmitere şi a protecţiei celor expuşi la contaminare.

BIBLIOGRAFIE

BITTON G., DAVIDSON J. M., FARRAH S. R. (1979), *On the value of soil columns for assessing the transport patterns of viruses through soils : a critical outlook*, Water, Air Soil Pollut., **12**, *4*, 449—457.

BURGE W. D., ENKIRI N. K. (1978), *Virus adsorption by five soils*, J. *Environ. Qual.*, **7**, *1*. 73—76.

CHARLES M. J., BITTON G., FARRAH S. R. (1979), *Development of cassein method for virus detection in soils*. In : Abstr. 79th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los Angeles, p. 225.

COOPER R. C., POTTER J. L., LEONG C. (1974), *Virus survival in solid waste treatment systems*. In : *Virus survival water and wastewater system*, Austin, pp. 218—232.

COOPER R. C., POTTER J. L., LEONG C. (1975), *Virus survival in solid waste leachates*, Water Res., **9**, *8*, 733—739.

DAMGAAR-LARSEN S., JENSEN K. O., LUND S., NISSEN B. (1977), *Survival and movement of enterovirus in connection with land disposal of sludges*, Water Res., **11**, *6* 503—508.

DMITREVA R. A., DOSKINA T. V. (1980), *Metodi videlienia chişecinih i respiratornih virusov iz razlicinih obiectov okrujaiuşcei sredi*, Ghigh. Sanit., *5*, 40—41.

DUBOISE S. M., SAGIK B. P., MOORE B.E.D., MALINA J. F. Jr. (1974), *Virus migration through soils*. In : *Virus survival water and wastewater systems*, Austin, pp. 233—240.

DUBOISE S. M., MOORE B. E., SORBER C. A., SAGIK B. P. (1979), *Viruses in soil systems*, Crc. crit. Rev. Microbiol., **7**, *3*, 245—285.

ENGELBRECHT R. S., WEBER M. J., AMIRHOR P., FOSTER D. H., LA ROSSA D. (1974) *Biological properties of sanitary landfill leachate*. În : *Virus survival water and Wastewater systems*, Austin, pp. 201—217.

FUHS G. W., MOORE R. S., REDDY M. M., STURMAN L. S., TAYLOR D. H. (1979), *A laboratory study of virus uptake by minerals and soils*. În : Proc. Water Reuse Symp., Washington, *3*, pp. 2274—2281.

FUNDERBURG S. W., MOORE B. E., SAGIK B.P., SORBER C. A. (1979), *Comparison of viral transport in several soils*. În : Abstr. 79 Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol. Los Angeles, pp. 227.

FUNDERBURG S. W., MOORE B. E., SAGIK B. P., SORBER C. A. (1981), *Viral transport, through soil columns under conditions of saturated flow*, Water Res., **15**, *6*, 703—711.

GERBA C. P., WALLIS C., MELNICK J. L. (1975), *Fate of wastewater and viruses in soil*, J. Irrig. Drain. Divis. amer. Soc. civ. Engin. *101*, 157—174.

GERBA C. P., GOYAL S. M., HURST C. I., LABELLE R. L. (1980), *Type and strain dependence of enterovirus adsorption to activated sludge, soils and estuarine sediments*, Water Res., **14**, *9*, 1197—1198.

GOYAL S. M., GERBA C. P. (1979), *Comparative adsorption of human enteroviruses, simian rotavrirus and selected bacteriophages to soils*. Appl. Environ. Microbiol., **38**, *2*, 241—247.

HURST C. I., GERBA C. P. (1979), *Development of quantitative method for the detection of enteroviruses in soil*, Text. J. Sci. **31**, *2*, 198—199.

HURST C. I., GERBA C. P., LANCE I. C. (1979), *Effect of environmental conditions on enterovirus survival in soil*. În : Abst. 79th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los Angeles, p. 227.

LANCE, I. C., GERBA C. P. (1979), *Virus removal from sewage during high rate land filtration*, Proc. Water Rense Symp., Washington, 2287—2297.

LANCE I. C., GERBA C. P. (1980), *Poliovirus movement during high-rate land filtration of sewage water*, J. environ. Qual., **9**, *1*, 31—34.

LANDRY E. F., VAUGHN I. M., THOMAS M. C., DELIHAS N. (1979a), *The adsorption, of enterovirus to soil cores and their subsequent elution by rainwater : laboratory strains virus field isolates*. În : Abst. 79th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los Angeles, p. 226.

Scanned with OKEN Scanner

LANDRY E. R., VAUGHN I. M., THOMAS M. Z., BECKWITH C. A. (1979b), *Adsorption of enteroviruses to soil cores and their subsequent elution by artificial rainwater* Appl. environ. Microbiol., **38**, *4*, 680–687.
LEFLER E., KOTT I. (1974a), *Virus retention and survival in sand.* In: *Virus survival water and wastewater systems*, Austin, pp. 84–91.
LEFLER E., KOTT Y. (1974b), *Enteric virus behaviour in sand dunes*, Iar. J. Technol., **12** *5–6*, 298–304.
MAZUR B., PACIORKIEWICZ W.., WOITOWICZ H. (1974), *Rosprzestrzeniante şie enterowirusów w środowisku człowieka*, Med. dósw. Microbiol., **26**, *1/2*, 133–144.
MELNICK J. L., GERBA P. C., WALLIS C. (1978), *Viruses in water*, Bull. O.M.S., **56**, *4*, 499–508.
MOORE R. S., TAYLOR D. H., STURMAN L. S., REDDY M. M. (1979), *pH and ionic effects on poliovirus interaction with three soils, a clay mineral and Ottawa sand.* In: Abst. 79 th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Los Angeles p. 227.
NESTOR I. (1973), *Prezenţa virusurilor enterice în sol*, Stud. Cerc. Inframicrobiol., **24**, *2*, 107–122.
REHSE W. (1977), *Elimination und Abbau von organischen fremdstoffen, pathogenen Keimen und Viren in Lockergestein. Ein beitrag zur dimensionerung der zone II (Engere Schurzzone) fur kies-sand-grundwasserleiter*, Z. dtsch. Geol. Ges., **128**, *2*, 319–329.
SCHAUB S. A., KENYON K. F., BLEDSOE B., THOMAS R. E. (1980), *Evaluation of the overland runoff mode on land wastewater treatment for virus removal*, Appl. environ. Microbiol., **39**, *1*, 127–134.
SCHEURMAN P. R., BITTON G., OVERMAN A. R., GIFFORD G. E. (1979), *Transport of viruses through organic soils and sediments*, J. environ Eng. Div. Proc. Amer. Soc. Civ. Eng., **105**, *4*, 629–640.
SOBSEY M. D., WALLIS C., MELNICK J. L. (1974), *Development of methods for detecting viruses in solid waste landfield leachates*, Appl. Microbiol., **28**, *2*, 232–238.
SOBSEY M. D., WALLIS C., MELNICK J. L. (1975), *Studies of the survival and fate of enteroviruses in an experimental model of a municipal solid waste landfill and leachate*, Appl. Microbiol., **30**, *4*, 565–574.
SOBSEY M. D., DEAN C. H., KNUCKLES M. E., WAGNER R. A. (1980), *Interactions and survival of enteric viruses in soil materials*, Appl. Environ. Microbiol., 40, *1*, 92–101.
TIERNEY J. T., SULLIVAN R., LARKIN E. P. 1977), *Persistence of poliovirus 1 in soil and in vegetable grown in soil previously flooded with inoculated sewage sludge or effluent*, Appl. environ. Microbiol., **33**, 109–113.
VILKER V. L., BURGE W. D. (1980), *Adsorption mass transfer model for virus transport in soils*, Water Res., **14**, *7*, 783–790.
WELLINGS F. M., LEWIS A. L., MOUNTAIN C. W., PIERCE L. (1975a), *Virginia demonstration of virus in ground water after effluent discharge onto soil*, Appl. Microbiol., **29**, *6*, 751–757.
WELLINGS F. M., LEWIS A. L., MOUNTAIN C. W. (1975b), *Survival of viruses in soil under natural conditions*, Proc. International Conference of Wastewater through Aquatic and Terrestrial Systems, Bellagio, pp. 453–478.
WELLINGS F. M., LEWIS A. L., MOUNTAIN C. W., STARK L. M. (1975c), *Virus consideration in land disposal of sewage effluents and sludge*, Fla. Sci., **38**, *4*, 202–207.
YEAGER I. G., O'BRIEN R. . (1979a), *Enterovirus inactivation in soil*, Appl. environ. Microbiol., **38**, *4*, 694–701.
YEAGER I. G., O'BRIEN R. T. (1979b), *Structural changes associated with poliovirus inactivation in soil*, Appl. environ. Microbiol., **38**, *4*, 702–709.
* * * W.H.O. (1979), *Les virus humains dans l'eau, les eaux usées et le sol*, Série Rapp. techn., n 639.

5.3. ENTEROVIRUSURI ÎN ALIMENTE

Rolul produselor alimentare în transmiterea unor infecţii bacteriene ca febra tifoidă, dizenteria, tuberculoza, bruceloza etc. este de mult timp bine cunoscut. Alimentele pot fi contaminate cu bacterii în cursul preparării, stocării sau prezentării lor. În condiţii optime, ele se pot multiplica şi determina îmbolnăviri. În ceea ce priveşte transmiterea pe cale alimentară a virusurilor, aceasta este mai rar descrisă datorită faptului că multiplicarea virusului nu se realizează decît pe substrat celular viu şi deci ali-

Scanned with OKEN Scanner

mentele trebuie să fie contaminate cu o cantitate considerabilă de doze infectante pentru a cauza o izbucnire epidemică evidentă. În plus, marea majoritate a alimentelor se prelucrează termic, ceea ce reduce posibilităţile de răspîndire a infecţiilor virale.

Rolul alimentelor în transmiterea enterovirusurilor este demonstrat de trei categorii de fapte: (a) observaţii epidemiologice care constau din descrierea unor epidemii de origine alimentară, (b) evidenţierea enterovirusurilor în diferite alimente prin examene de laborator şi (c) cercetări experimentale care au ca scop cunoaşterea duratei de supravieţuire sau a modalităţilor de inactivare a enterovirusurilor în diferite produse alimentare.

5.3.1. ÎMBOLNĂVIRI DE ORIGINE ALIMENTARĂ

În general, pentru ca o epidemie să fie considerată de origine alimentară se impun cîteva condiţii de ordin epidemiologic şi virusologic:

— existenţa unui produs alimentar care să fi fost consumat de toţi cei îmbolnăviţi;

— punerea în evidenţă a agentului patogen în alimentul suspect;

— depistarea sursei de infecţie.

În infecţiile enterovirale aceste condiţii se întrunesc relativ rar datorită perioadei lungi de incubaţie care face dificilă stabilirea, prin anchetă epidemiologică, a alimentului incriminat şi a sursei de infecţie precum şi datorită aspectului benign al îmbolnăvirilor care rămîn necunoscute medicului. La aceasta se adaugă imperfecţiunea metodelor de detectare a enterovirusurilor în produsele alimentare.

Din aceste motive, se admite astăzi că rolul alimentelor în transmiterea infecţiilor enterovirale este în realitate cu mult mai mare decît se poate demonstra, referate generale consacrate acestei probleme fiind din ce în ce mai frecvente în literatura de specialitate din ultimii ani (Aizen şi Pille, 1976; Eyles, 1978; Labie, 1979; Zavate şi colab., 1979).

Într-o primă etapă, epidemiile alimentare determinate de enterovirusuri se datorau aproape în totalitate poliovirusului, iar alimentul incriminat a fost cel mai adesea laptele crud. După Aizen şi Pille (1976), numărul de îmbolnăviri a fost în general redus, de 4—8 cazuri, dar s-au descris şi izbucniri epidemice cu 36 şi 62 de cazuri. În ultimii ani, epidemiile de origine alimentară cu virus poliomielitic au devenit excepţionale datorită faptului că laptele, alimentul cel mai des incriminat, se consumă de regulă pasteurizat iar circulaţia poliovirusului sălbatic s-a redus considerabil după introducerea vaccinării orale cu virus viu atenuat. Epidemiile determinate de consumarea laptelui pasteurizat s-au datorat unei contaminări secundare, cu ocazia distribuirii sale în condiţii insalubre. Episoade epidemice determinate de poliovirus au fost descrise şi după consum de limonadă sau prăjituri cu cremă.

Implicarea, prin ancheta epidemiologică, a alimentelor ca vehicul în mai multe izbucniri de poliomielită sugerează că şi alte enterovirusuri umane din grupul Coxsackie şi ECHO ar putea fi transmise în acelaşi mod. Totuşi, literatura de specialitate este aproape lipsită de semnalări de episoade epidemice determinate de enterovirusuri nepoliomielitice transmise prin alimente. S-a descris o epidemie în care s-a reuşit izolarea virusului Coxsackie B1 atît din produsele patologice a celor îmbolnăviţi cît şi din condimentele ce s-au adăugat la o supă consumată de aceştia (Oşerovici

Scanned with OKEN Scanner

și Kasownikova, 1967) și o alta determinată de virusul ECHO tip 4 survenită la un grup de militari cu familiile lor, infectați cu ocazia unui picnic (* * *, 1979a).

5.3.2. PREZENȚA ENTEROVIRUSURILOR ÎN DIFERITE ALIMENTE

Contaminarea virală a alimentelor se poate face direct de la excretorul de virus bolnav sau purtător sănătos, fie indirect prin apa poluată care a servit la spălatul vaselor, a legumelor sau la prepararea răcoritoarelor precum și prin insecte.

Odată contaminate, numeroase alimente prezintă suficiente condiții favorabile pentru a permite supraviețuirea enterovirusurilor un timp îndelungat, motiv pentru care independent de vreun episod epidemic, ele au putut fi puse în evidență prin examene virusologice efectuate pe probe de alimente recoltate în teren. S-au evidențiat astfel, în proporții variabile, enterovirusuri în lapte și produse lactate, carne și produse de carne, scoici, sucuri de fructe, salate și condimente.

a) *Lapte și produse lactate.* După Kefford și colab. (1979), laptele și produsele lactate impurificate cu enterovirusuri sînt legate de numeroase îmbolnăviri în Australia. În U.R.S.S., Kazanțeva și colab. (1977) au evidențiat enterovirusurile în 18% din cele 562 de probe de lapte sau produse lactate cercetate în zona Moscovei iar Oșerovici și colab. (1981) în 16—17% din cele 1 172 de probe.

Din punctul de vedere al periculozității, se admite că brînza preparată din lapte crud comportă un risc mai mare de contaminare în comparație cu laptele care de regulă se consumă pasteurizat (Kalitina, 1971).

b) *Carne și produse de carne.* Izolarea de enterovirusuri (polio și ECHO tip 6) a fost posibilă în carnea livrată pe piață, probabil infectată secundar (Sullivan și colab., 1970). Kostenbader și Cliver (1977) au întreprins o serie de investigații virusologice pe diferite produse de carne de vită, porc și de pasăre fără să reușească a izola vreo tulpină de enterovirusuri.

c) *Animale acvatice.* Contaminarea animalelor acvatice, marine în special, este explicabilă datorită faptului că virusurile își păstrează viabilitatea lor în apa de mare un timp îndelungat, curenții maritimi fiind capabili să transporte pe distanțe mari (peste 6 km) enterovirusurile provenite din apele de canal.

Prin organismul stridiilor și midiillor se filtrează zilnic aproximativ 50—100 de litri de apă ceea ce duce la acumularea diferitelor substanțe (produse chimice, pesticide), a bacteriilor și a virusurilor în organismul acestor moluște, care devin în această din urmă situație adevărate rezervoare de enterovirusuri. Crabii se pot contamina la rîndul lor fie direct din apă, fie prin consum de scoici și stridii.

Riscul prezentat de aceste animale acvatice pentru om constă din faptul că adeseori ele sînt consumate în stare crudă, fără vreo prelucrare termică.

În ultimul deceniu au fost raportate numeroase izolări de enterovirusuri de la scoici și stridii capturate din apa de mare, din bazine de crescătorii, procurate din comerț proaspete sau congelate, în proporții variind între 2,6 și 40,5% din loturile studiate (Denis, 1974; * * * 1977; * * * 1979; Vaughn și colab., 1980; Ellender și colab., 1980). Goyal și colab. (1979) au arătat că din 40 de loturi a cîte 10—12 stridii, enterovirusurile

(polio şi ECHO) au fost prezente în 14 loturi (35%) în concentraţii de 6—274 UFP/100 g. În 44 probe de apă de mare recoltate de pe litoralul golfului Mexic, din care au fost pescuite stridiile respective, enterovirusurile au fost prezente în 26 de probe (59%). Aceste probe de apă au fost corespunzătoare din punct de vedere bacteriologic, ceea ce reflectă că standardele bacteriologice uzuale nu pot fi considerate ca satisfăcătoare pentru aprecierea poluării virale a apei de mare şi a animalelor acvatice din aceasta.

d) *Vegetale*. Folosirea apelor reziduale contaminate cu enterovirusuri pentru irigaţie determină contaminarea solului şi a plantelor cultivate pe aceste soluri. În U.R.S.S., Babov şi colab. (1971), în cadrul unui studiu privind circulaţia enterovirusurilor în oraşul Odesa, au efectuat examene virusologice în spălături de legume (roşii) recoltate de pe terenuri cultivate şi irigate cu ape reziduale. S-au examinat 64 de probe izolîndu-se o tulpină de virus ECHO tip 11 (1,6%). Bondarenko şi Grigorieva (1975) din spălăturile de pe diferite legume şi fructe au reuşit să izoleze enterovirusuri într-o proporţie mult mai mare : 37 de tulpini din totalul celor 457 de probe examinate (8,0%). În Israel, Sadovski şi colab. (1978) au pus în evidenţă enterovirusuri pe castraveţi cultivaţi pe teren irigat cu ape uzate, iar în S.U.A. Kostenbader şi Cliver (1977) au efectuat investigaţii privind prezenţa enterovirusurilor în instalaţiile unei întreprinderi de prelucrare a produselor vegetale, rezultatele obţinute fiind negative.

În general, aşa cum se poate remarca, studiile privind prezenţa enterovirusurilor în diferite produse alimentare sînt relativ reduse la număr, aceasta în special datorită metodelor laborioase de lucru şi a numărului redus de cercetători care se ocupă de virologie alimentară.

5 3.3. METODE DE EVIDENŢIERE A ENTEROVIRUSURILOR ÎN DIFERITE ALIMENTE

Se admite că în prezent nu există încă metode de rutină care prin simplitate, sensibilitate şi preţ redus de cost să poată rezolva punerea în evidenţă a virusurilor în alimente.

Din aceste motive, problema metodelor de evidenţiere a enterovirusurilor în alimente constituie o preocupare de bază a numeroase colective, majoritatea studiilor avînd caracter experimental care constă din contaminarea artificilă a produsului respectiv cu virusuri în diferite diluţii şi verificarea sensibilităţii metodelor propuse, prin reizolarea lor.

Întrucît, în mod natural, în produsele alimentare există de obicei o cantitate redusă de particule virale, pe o unitate de volum, apare necesară concentrarea acestora şi, totodată, debarasarea alimentului de substanţele de balast. Se admite că detectarea enterovirusurilor din diferite produse alimentare fără concentrare este posibilă numai dacă în produs se află cel puţin 100 de UFP pe 25 g.

În aceste condiţii, o metodă optimă de detectare a enterovirusurilor în alimente trebuie să cuprindă următorii timpi : prepararea probelor, eliberarea şi separarea virusurilor, recuperarea lor, concentrarea virusurilor recuperate şi îndepărtarea contaminanţilor nevirali.

În continuare redăm cîteva metode pe care le considerăm de elecţie pentru prelucrarea unor produse alimentare în vederea concentrării enterovirusurilor înainte de inocularea pe gazde de laborator.

a) *Lapte şi produse lactate*. Pe baza studiilor experimentale efectuate pe lapte şi brînză contaminate cu poliovirus, virus Coxsackie B3 şi ECHO

Scanned with OKEN Scanner

tip 7. Aizen (1978) a arătat că reizolarea este posibilă numai atunci cînd virusul se găseşte în cantitate de cel puţin 70 UFP/25g produs, ceea ce impune concentrarea lor.

Pentru lapte, Kazanţeva şi colab. (1978) au propus următoarea metodă de prelucrare şi concentrare:

— 5 ml lapte + 5 ml freon 113 cu masă specifică de 1,36;
— agitare manuală timp de 2—3 minute;
— centrifugare la 5 000 t/m timp de 10 minute;
— inocularea supernatantului.

Pentru brînza de vaci, Aizen şi Pille (1973) au propus următoarea metodă pentru izolarea poliovirusului introdus ca indicator în diferite doze în acest produs alimentar:

— tratarea probei cu 5 g $MgCl_2$;
— omogenizarea unei cantităţi de 25 g brînză la aparatul de triturare a ţesuturilor timp de 2 minute la 8 000 t/m cu 25 ml soluţie tampon (glicol pH 9,0 cu PBS pH 8,2) şi cu 25 ml freon 113;
— centrifugarea omogenatului la 3 000 t/m timp de 30 minute;
— tratarea lichidului supernatant cu PEG—6000 în cantitate de 6—10% cu adăugare concomitentă a NaCl pînă la obţinerea unei soluţii 0,5 M;
— agitare puternică a amestecului pînă la completa solvire a substanţei, stocarea probei 1 oră la +4°C şi centrifugare 30 de minute la 3 000 t/m;
— resuspendare în 1—2 ml ser fiziologic sau TFS pH 7,8 şi inoculare pe gazde de laborator.

Această metodă poate fi aplicată chiar în laboratoare de virusologie mai puţin dotate.

Pentru brînză sărată, Kostenbader şi Cliver (1973) au propus o metodă de prelucrare şi concentrare a enterovirusurilor (ECHO tip 6 şi polio) care constă din:

— adăugare la probă a 100 ml tampon-glicină-NaOH cu pH 8,8;
— agitare;
— purificare prin filtre cu fibre celuloză-carbon-sticlă cu porozitate de 0,2 μm;
— concentrare prin ultrafiltrare (pori cu diametrul de 30 000 daltoni) şi inoculare pe gazde de laborator.

b) *Carne şi produse de carne.* De-a lungul timpului pentru purificarea şi concentrarea enterovirusurilor din carne probele au fost tratate cu bentonită sau freon 113, eter, dializate în PEG, ultrafiltrate sau filtrate prin vată de sticlă (Herrmann şi Cliver, 1968; Aizen şi Pille, 1972; Aizen, 1978; Kalitina, 1972; Kalitina, 1975b; Larkin şi colab., 1975).

Dezavantajul acestor metode constă din volumul ridicat de muncă şi necesitatea unei aparaturi greu accesibile. În plus, se consideră că unele preparate de bentonită pot adsorbi enterovirusurile iar în cursul dializei poate avea loc, de asemenea, adsorbirea virusului pe membrana dializată.

Konowalchuk şi Speirs (1973) au utilizat pentru concentrarea enterovirusurilor din probe de carne tehnica ultrafiltrării.

În anul 1978, Kalitina propune pentru carnea tocată următoarea metodă verificată experimental după contaminarea produsului cu poliovirus, virus Coxsackie B3, A9 şi ECHO 11 şi care a permis reizolarea a 93% din cantitatea iniţială de virus:

Scanned with OKEN Scanner

— omogenizarea probei cu soluţie Hanks 1/10 în micromixerul de ţesuturi, timp de 2 minute;

— centrifugare la 3 000 t/m timp de 20 de minute;

— tratare cu silicogel 5% sau PVP 10%, PEG 10% sau gel de hidrat oxid de aluminiu;

— agitare 1 oră la agitator mecanic, repaus 18 ore la +4°C;

— centrifugare redusă timp de 30 minute;

— adăugare la sediment a 1—1,5 ml mediu 199 pentru PVP şi soluţie de glicocol pentru ceilalţi precipitanţi;

— agitare 1 oră, centrifugare şi inocularea supernatantului pe gazde de laborator.

Recent, Finance şi colab. (1981) au propus pentru carne şi scoici diluarea probelor cu apă demineralizată la pH 9 cu 8,000 mg ClNa/l şi apoi concentrarea prin ultrafiltrare sau ultracentrifugare.

S-a evidenţiat importanţa alegerii substratului de culturi celulare pentru izolarea enterovirusurilor din carnea tocată (Kostenbader şi Cliver, 1979).

c) *Animale acvatice*. În ţările în care există un consum larg al scoicilor neprelucrate termic, acestea fiind pescuite din apele marine sau din estuare sau înmulţite în crescătorii, s-a acordat o atenţie deosebită controlului sanitar al apelor şi al moluştelor, ceea ce a reclamat punerea la punct şi unificarea metodelor de detectare a enterovirusurilor din corpul acestor animale (Denis, 1974; Sobsey şi colab., 1975; Vaughn şi colab., 1979; Metcalf şi colab., 1980; Landry şi colab., 1980; Tierney şi colab., 1980). În acest scop a fost instituit un studiu colaborativ (Larkin şi Metcalf, 1980; Metcalf şi colab., 1980) cu care ocazie s-a propus o metodă perfecţionată de izolare a enterovirusurilor din moluşte care constă din:

— adăugare de TFS răcit la gheaţă, pH 7,2 în cantitate de 100 ml/100 g de probă;

— centrifugare la rece la 16 000 t/m de 4 ori a cîte 30 sec;

— adăugare 3% extract de carne de vită pentru omogenizare (7 părţi extract de carne în mililitri şi o parte probă în grame);

— ajustarea pH-ului la 9,0; concentraţia de NaCl pînă la ≥ 9 000 mg/l se amestecă 10 minute;

— ultrasonarea la 100 W timp de 10 minute în baie de gheaţă;

— centrifugare la 10 000 t/m şi separarea supernatantului;

— ajustarea pH-ului la 4,0, concentraţia sării NaCl ≤ 4 000 mg/l se amestecă 10 minute;

— centrifugare la 10 000 t/m şi colectarea precipitatului;

— resuspendarea precipitatului cu $NaHPO_4$, 0,15 M, pH 9,5 (în volum de 7 ori faţă de masa precipitatului);

— adăugare de „Cat-Floc" în proporţie de 0,5 ml/100 ml de volum al suspensiei; se amestecă 10 minute; se centrifughează la 10 000 t/m şi se colectează supernatantul;

— adăugarea unui volum egal de extract de carne de vită 3%; se ajustează la pH 4,0, concentraţia de NaCl ≤ 4 000 mg/l; se amestecă 10 minute; centrifugare la 10 000 t/m şi colectarea precipitatului;

— resuspendarea precipitatului în volum minim de 0,15 M Na_2HPO_4, pH 9,5 (volumul nu trebuie să depăşească 30 ml); pH-ul se ajustează la 7,2;

— tratarea probei cu amestec de antibiotice timp de 2 ore la 26°C, avînd o concentraţie finală pe ml de 200 U penicilină, 200 μg streptomicină, 50 μm gentamicină, 2,5 μg fungitone.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru reușita metodei se mai accentuează asupra calității culturilor celulare utilizate pentru izolarea enterovirusurilor. Se preferă inocularea concomitentă pe mai multe tipuri de culturi celulare. Pentru îndepărtarea contaminărilor bacteriene se preferă adăugarea de antibiotice și mai puțin tratarea cu eter sau filtrarea.

Recent, Johnson și colab. (1981) au obținut la rîndul lor rezultate bune (reizolare 73%) cu următoarea metodă pentru detectarea enterovirusurilor din moluște:

— eluție în tampon glicină pH 9,5 și extract de carne;

— desorbție și purificare cu „Cat-Floc".

d) *Vegetale*. În jurul anului 1970 au fost puse la punct metode de detectare a enterovirusurilor de pe diferite fructe sau legume ca fragi (Herrmann și Cliver, 1968), roșii (Cliver și Grindrod, 1969), castraveți și vinete (Sadovski și colab., 1974), morcovi (Kostenbader și Cliver, 1973), salată (Kostenbader și Cliver, 1973). Pentru concentrare s-a utilizat PEG sau/și ultracentrifugarea.

În 1975, Bondarenko și Grigorieva au utilizat pentru detectarea enterovirsurilor în spălăturile de pe legume și fructe o metodă care consta din: spălarea în ser fiziologic sau PGP a suprafeței fructelor sau legumelor, tratarea cu antibiotice și inocularea pe culturi celulare.

5.3.4. STUDII EXPERIMENTALE PRIVIND SUPRAVIEȚUIREA ENTEROVIRUSURILOR ÎN DIFERITE ALIMENTE

Studiile asupra duratei de supraviețuire a enterovirusurilor în diferite produse alimentare și în diferite condiții de păstrare prezintă o deosebită importanță deoarece demonstrează posibilitatea transmiterii infecțiilor la om și permite descifrarea unor aspecte epidemiologice particulare a bolilor enterovirale.

a) *Lapte și produse lactate*. Autoarea sovietică Kalitina, într-o serie de lucrări inițiate încă din anul 1967 (Kalitina, 1969; Kalitina, 1971; Kalitina, 1975a), a demonstrat — în variate condiții experimentale de temperatură, contaminare bacteriană, concentrație de virus etc. — lunga durată de supraviețuire a enterovirusurilor în lapte și produse lactate. Aceste cercetări, la care se adaugă și cele ale altor autori, au demonstrat că durata de supraviețuire a enterovirusurilor în lapte, chefir, iaurt, brînză de vaci, caș și telemea depășește cu mult termenul de perisabilitate a alimentelor respective (tabelul 5.9).

S-a stabilit că viabilitatea enterovirusurilor în lapte și produse lactate depinde în mare măsură de temperatura la care au fost păstrate aceste alimente, durata de supraviețuire fiind cu atît mai mare cu cît temperatura de păstrare a fost mai joasă. S-au înregistrat, de asemenea, diferențe privind durata de supraviețuire în raport cu tipul antigenic de enterovirus și cu concentrația inițială de virus cu care s-a făcut contaminarea (Kalitina, 1969; Kalitina, 1971).

În cercetările în care s-a testat viabilitatea enterovirusurilor în prezența și în absența contaminării bacteriene a alimentului, obținută prin autoclavarea prealabilă (Kalitina, 1971), s-au constatat diferențe nete în durata de supraviețuire a acestora. Procesul de fermentare a laptelui din iaurt și chefir nu a influențat dinamica supraviețuirii enterovirusurilor (Kiseleva, 1971) care au fost regăsite în produsele contaminate peste 12—15 zile, termenul maxim de urmărire.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.9

Durata de supraviețuire a unor enterovirusuri în lapte și produse lactate

Produsul	Autorul	Anul	Virusul	Timp de supraviețuire (zile)
Lapte	Kalitina Kiseleva Tiron și colab.	1969 1971 1980	Coxsackie A9, B3, ECHO 11 8 tulpini de enterovirus Poliovirus, Coxsackie B3	30—90 >10 15—90
Chefir	Kiseleva	1971	8 tulpini de enterovirus	>15
Iaurt	Kiseleva	1971	8 tulpini de enterovirus	>15
Brînză de vaci	Kalitina Kalitina	1969 1971	Coxsackie A9, B3, ECHO 11 idem	60—120 30—240
Caș	Bârzu și colab.	1970	Coxsackie A2	⩾54
Telemea	Bârzu și colab.	1970	Coxsackie A2	⩾68

În țara noastră, în laboratorul de virusologie al Institutului de igienă și sănătate publică Iași, s-a instituit un experiment pe două categorii de lapte (pasteurizat și fiert) păstrate la 4°C și 25°C, contaminate cu poliovirusul vaccinant tip 1 și virusul Coxsackie B3 (Tiron și colab., 1980).

S-a constatat că durata de supraviețuire a enterovirusurilor în lapte a depășit cu mult termenul de perisabilitate al acestui aliment, variind între 15 și 90 zile. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între durata de supraviețuire a ambelor enterovirsuri în laptele pasteurizat și cel fiert. În ceea ce privește tipul antigenic, s-a constatat că poliovirusul vaccinant tip 1 a fost în unele condiții de temperatură mai puțin rezistent decît virusul Coxsackie B3.

Factorul care a influențat în modul cel mai evident durata de supraviețuire a enterovirusurilor în lapte a fost temperatura. Astfel, în timp ce la temperatura de 25°C durata de supraviețuire a virusului poliomielitic a variat între 5 și 15 zile în laptele pasteurizat și 15—30 de zile în cel fiert, la temperatura de 4°C durata de supraviețuire a depășit în ambele probe de lapte 90 de zile. Același fenomen s-a constatat și pentru virusul Coxsackie B3 care, atît în laptele pasteurizat cît și în cel fiert, a supraviețuit aproximativ 30 de zile la 25°C, în timp ce la 4°C virusul mai era încă prezent în produs la 90 de zile (fig. 5.9).

Gradul de inactivare a enterovirusurilor a fost apreciat prin compararea titrului tulpinilor reizolate față de titrul inițial. S-a constatat că scăderea titrului a variat între 0,6 și 4,2 log DCP_{50}/ml, fiind mai lentă la temperatura de 4°C, în comparație cu cea de 25°C.

b) *Carne și produse de carne.* S-a dovedit experimental că poliovirusul, luat ca indicator, a supraviețuit în carnea tocată crudă între 18 și 30 de zile de la contaminarea produsului (Larkin și colab., 1975), iar pe suprafața pîrjoalelor, contaminate experimental după preparare, cel puțin 36 de ore (timp de observație) la + 4°C (Aizen și Pille, 1972).

c) *Animale acvatice.* Scoicile, moluștele, crabii etc. se pot contamina cu diferite enterovirusuri în cazul în care trăiesc într-o apă poluată. Aceasta a fost dovedit prin studii experimentale efectuate cel mai adesea cu poliovirus dar și cu virusurile Coxsackie și ECHO (Chang și colab.,

Scanned with OKEN Scanner

1971; Denis, 1974; Di Girolamo şi colab., 1975). S-a precizat că după o oră de şedere în apă în organismul moluştei se găseşte o cantitate de 10 ori pînă la 60 de ori mai mare decît cea iniţială din apa contaminată. Se consideră că este vorba numai de o acumulare sau concentrare mecanică de virusuri şi nu de o multiplicare a lor în organismul moluştelor. Totuşi, în organismul moluştelor s-au pus în evidenţă în ţesuturi unele modificări histologice, enzimatice şi imunologice. Virusurile au fost găsite mai

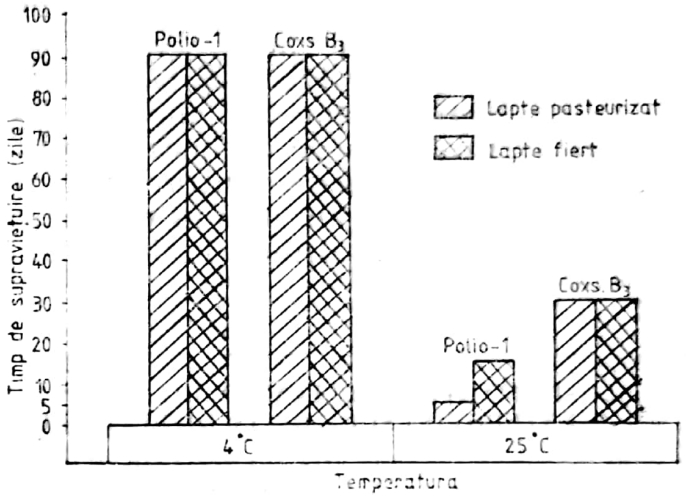


Fig. 5.9. — Durata de supravieţuire a unor enterovirusri în lapte, în raport cu temperatura.

întîi în ţesuturile extradigestive şi apoi au migrat spre glandele digestive. Supravieţuirea enterovirusurilor în moluşte poate atinge durata de 5 luni, fiind influenţată de turbiditatea, salinitatea, temperatura apei şi de specia de moluscă.

Recent, s-a stabilit că enterovirusurile se acumulează şi în organismul unor specii de crabi comestibili putînd fi reizolate din hemolimfă, tract digestiv şi muşchii acestora (Hejkal şi Gerba, 1980).

Dintre moluştele mai frecvent studiate menţionăm: *Crassostrea gigas* (Vaughn şi colab., 1979; Landry şi colab., 1980; Finance şi colab., 1981), *Crassostrea virginica* (Metcalf şi colab., 1980 a,b,; Larkin şi colab., 1980; Ellender şi colab., 1980; Vaughn şi colab., 1980), *Mercenaria mercenaria* (Metcalf şi colab., 1979; Larkin şi colab., 1980; Metcalf şi colab., 1980 a,b; Vaughn şi colab., 1980), *Mya arenaria* (Metcalf şi colab., 1980, a,b; Larkin şi colab., 1980), *Tapes japonica* (Johnson şi colab., 1981), *Mylitus coliforniasus* (Di Girolamo şi colab., 1972), *Mylitus edulis* (Finance şi colab., 1981), iar dintre crabi *Callinectes sapidus* (Hejkal şi Gerba, 1980) şi *Pachygrapsus sp.* şi *Hemigrapsus sp.* (Di Girolamo şi colab., 1972).

d) *Vegetale.* În condiţii naturale de cultivare pe terenuri irigate cu ape reziduale contaminate experimental, supravieţuirea îndelungată a enterovirusurilor pe salată, ridichi, roşii, ardei, varză etc. a fost demonstrată de mai mulţi autori (Grigorieva şi colab., 1966; Kott şi Fishelson, 1974; Larkin şi colab., 1976).

Enterovirusurile au fost regăsite pe legume după o perioadă variind între 14 şi 36 de zile, în raport cu iradierea solară, temperatura aerului, regimul ploilor şi, în special, cu gradul de umiditate. Întrucît metodele de tratare a apelor reziduale sînt ineficiente din punctul de vedere al inactivării virusurilor se consideră că irigarea solului cultivat cu legume cu ape reziduale constituie un pericol pentru sănătatea populaţiei.

e) *Alte alimente.* Au mai fost instituite experimentări care au demonstrat supraviețuirea unor enterovirusuri și în alte categorii de alimente. Astfel, Cliver și colab. (1970) au studiat durata de supraviețuire a poliovirusului și virusului ECHO tip 6 în diferite meniuri cu alimente intenționat modificate prin uscare și prin îngheț: pătrate de slănină, cremă de porumb, spaghete cu sos de carne rehidratate, piure de banane. S-a constatat că enterovirusurile au rezistat mai mult de 2 săptămîni la temperatura camerei și mai mult de 2 luni în frigider.

Kiseleva (1971) a studiat supraviețuirea a 8 tulpini de enterovirusuri pe bucăți de pîine contaminate la suprafață cu o suspensie virală în concentrație de 10 000 DCP_{50}/ml și păstrate în condiții de desfacere similare celor din comerț: cu sau fără ambalaj. La 18—24°C virusurile și-au păstrat viabilitatea timp de cel puțin 4 zile (timp de urmărire). Scăderea titrului a fost mai mare pentru pîinea descoperită (2,5 log DCP_{50}/ml) decît pentru cea păstrată într-un vas acoperit (1,0 log DCP_{50}/ml), ceea ce reflectă că uscarea contribuie la dispariția mai rapidă a enterovirusurilor de pe pîine.

5.3.5. POSIBILITĂȚILE DE INACTIVARE A ENTEROVIRUSURILOR ÎN DIFERITE ALIMENTE

Eforturile care se fac în ultimii ani pe plan mondial pentru organizarea bazelor unei virologii alimentare care prin punerea la punct a unei metodologii specifice să permită cunoașterea reală a gradului de poluare virală a alimentelor și a repercusiunilor ei asupra stării de sănătate a populației au ca scop final găsirea unor mijloace cît mai eficiente de prevenire a contaminării alimentelor sau de inactivare a virusurilor în alimente deja contaminate.

Acesta este motivul pentru care, în literatura de specialitate, există preocupări privind tehnologia preparării produselor alimentare din punctul de vedere al inactivării virusurilor prin căldură, congelare, liofilizare, acțiunea razelor gama etc. (* * * 1977; Kostenbader și Cliver, 1977; * * * 1979b).

a) *Lapte și produse lactate.* După Kefford și colab. (1979), pasteurizarea laptelui cu creșterea temperaturii de scurtă durată nu poate asigura inactivarea în totalitate a virusurilor. Dimpotrivă, eficiența pasteurizării înalte a laptelui a fost demonstrată încă acum cîteva decenii, introducerea în practică a acestei măsuri profilactice traducîndu-se printr-o scădere a morbidității prin poliomielită. Rămîne pericolul contaminării secundare a laptelui și a poluării produselor lactate care se prepară din lapte crud contaminat primar.

Eficiența pasteurizării laptelui în procesul de preparare a brînzeturilor proaspete și sărate a fost studiată în Institutul de igienă și sănătate publică Iași încă din anul 1970 de către Bârzu și colab. Autorii au contaminat experimental trei loturi a cîte 5 litri de lapte cu virus Coxsackie A2 după care un lot a fost pasteurizat timp de 30 minute la 63°C, altul timp de 2 secunde la 75°C și al treilea a rămas nepasteurizat. Din toate cele trei loturi de lapte s-a preparat caș proaspăt și telemea după rețete similare celor utilizate în industria laptelui. În continuare s-au efectuat examene virusologice pentru a se testa durata de supraviețuire a virusului în aceste produse lactate. Rezultatele virusologice obținute pe probe de caș recoltate la 1, 3 și 4 zile sînt redate în tabelul 5.10 din care reiese că pasteuri-

zarea laptelui a dus la inactivarea totală a virusului în timp ce din caşul preparat din lapte nepasteurizat s-a reuşit reizolarea tulpinii introduse experimental la toate controalele efectuate.

Tabelul 5.10

Controlul viabilităţii virusului Coxsackie A2 în caş preparat din lapte pasteurizat după contaminare şi, comparativ, nepasteurizat (Bârzu şi colab., 1970)

Şoareci	Caş preparat din lapte:								
	pasteurizat după contaminare						nepasteurizat		
	30 minute la 63°C			2 secunde la 75°C			—		
	zi de control			zi de control			zi de control		
	1	3	4	1	3	4	1	3	4
Inoculaţi	10	12	8	10	5	9	7	8	7
Morţi din alte cauze	—	—	1	1	—	—	—	1	—
Rămaşi în experienţă	10	12	7	9	5	9	7	7	7
Paralizaţi	0	0	0	0	0	0	7	7	7

Din telemeaua preparată din cele trei loturi de caş, virusul Coxsackie A2 a fost reizolat la 24 de ore şi la 68 de zile, iar din saramura (13—19% ClNa) utilizată pentru aceasta, la 9 şi la 20 de zile, ceea ce demonsreazâ că concentraţiile relativ mari de sare nu au inactivat virusul Coxsackie A2. În consecinţă, în cazurile în care se prepară brînza telemea din lapte nepasteurizat este necesar a se introduce în STAS recomandarea ca la fiecare lot de telemea să fie preparate saramuri proaspete, pentru a se evita contaminarea succesivă a mai multor loturi de brînză prin intermediul saramurilor, în cazul pătrunderii accidentale a virusurilor în circuitul de producţie.

Tabelul 5.11

Inactivarea celor trei tipuri antigenice de poliovirus în lapte prin pasteurizarea la temperatura de 70—80°C cu expunere de 20—30 de secunde (Kazanţeva şi colab., 1978)

Poliovirus		Expunerea (secunde)	Cantitatea de virus din probele de lapte (în log. UFP/0,2 ml)	
Tip	Tulpina		Înainte de pasteurizare	După pasteurizare
I	LSe 2 ab	20	3,12	<0,005
		30	3,90	<0,005
II	P—712	20	4,30	<0,005
		30	4,30	<0,005
III	Leon	20	4,35	<0,005
		30	4,55	<0,005
I	Mahoney	20	4,30	<0,005
		30	4,30	<0,005

Kazanţeva şi colab. (1978) şi Oşerovici şi colab. (1981) au studiat pe larg eficienţa regimului de pasteurizare a laptelui aplicat în U.R.S.S. faţă de enterovirusuri (indicator poliovirusul). Autorii au ajuns la concluzia că pasteurizarea laptelui la 74—76°C timp de 20 de secunde permite inactivarea enterovirusurilor (tabelul 5.11).

Scanned with OKEN Scanner

S-a stabilit că scăderea titrului a început după 20 de secunde la 48°C iar la 58°C nu s-au mai găsit particule virale. S-a apreciat că tulpinile izolate de unii cercetători din produsul finit au fost probabil rezultatul unei contaminări secundare, survenite după pasteurizare. Tierney şi Larkin (1978) au studiat cauzele posibile ale eşecurilor în inactivarea termică a laptelui. Autorii au arătat că pentru a avea rezultate favorabile este necesar ca în timpul inactivării temperatura să fie egală în toată masa lichidului, ceea ce impune agitarea continuă a acestuia.

b) *Carne şi produse de carne.* Pentru această categorie de alimente a fost luată în studiu eficienţa prelucrării termice a preparatelor ca singura metodă posibilă de inactivare a enterovirusurilor. Astfel, Aizen şi Pille (1972) au cercetat (în chiftele contaminate în interior) supravieţuirea virusurilor Coxsackie B3 şi polio tip 1, considerate drept serotipurile cele mai termorezistente. După o prăjire în ulei timp de 4 minute, care a realizat în interiorul chiftelei o temperatură de 75—80°C (măsurată cu un termocuplu) enterovirusurile au fost total inactivate, chiar în aceste condiţii de contaminare experimentală masivă care în natură nu se poate realiza decît cu totul excepţional. Contaminarea la suprafaţa pîrjoalelor calde, după prăjire, şi testarea infecţiozităţii produsului imediat şi după 36 de ore, la 4°C au arătat că poliovirusurile nu au fost deloc inactivate (Aizen şi Pille, 1972).

Filippi şi Banwart (1974), studiind sensibilitatea la încălzire a poliovirusului în tocătura de carne de vită cu conţinut variabil de grăsime au arătat că inactivarea termică a fost mai redusă în cazul unui conţinut mare în grăsimi care se comportă ca un factor protector. Inactivarea completă a poliovirusului într-o cantitate de 100 g biftec cu un conţinut de 30% grăsimi, contaminat cu 30 UFP/g virus, s-a obţinut în 10 minute la 70°C şi în 7 minute la 80°C.

Sullivan şi colab. (1975) au investigat, la rîndul lor, rezistenţa termică a poliovirusului tip 1 şi virusului Coxsackie B2 introduse în carnea de vită tocată şi prăjită sub formă de chiftele. Temperatura interioară era corelată cu aspectul macroscopic al tocăturii din interior: la 60°C, aspect roşu/roz = prăjite insuficient; la 71°C aspect roz/brun = prăjite mijlociu; la 76,7°C aspect brun = bine prăjite. Examenele virusologice au arătat că virusul a putut fi reizolat în 8 din 24 de chiftele preparate la 60°C şi răcite la temperatura camerei timp de trei minute. În chiftelele prăjite la 71°C şi la 76,7° C reizolarea nu a mai fost posibilă. Autorii au arătat în concluzie că în chiftelele în care centrul cărnii rămîne roşu eventualele virusuri pot rămîne infectante.

Kostenbader şi Cliver (1977) care au efectuat investigaţii privind supravieţuirea virusurilor polio şi Coxsackie A9 în cadrul a 7 procedee tehnologice de prelucrare a unor conserve, dintre care trei de carne, au arătat că acestea nu mai pot fi regăsite în produsul final.

c) *Animale acvatice.* Contaminarea crescătoriilor de stridii destinate consumului alimentar a ridicat o serie de probleme sanitare şi economice care au impus luarea unor măsuri de decontaminare a acestora şi, totodată, de introducere a unui control periodic al poluării bazinelor (Ellender şi colab., 1980).

Se consideră că dacă moluştele şi crustaceele contaminate sînt mutate într-o apă nepopulată ele devin necontaminate şi deci proprii consumului după un interval de timp care este mai mic pentru bacterii şi mai îndelungat pentru virusuri (* * *, 1980).

Scanned with OKEN Scanner

Un aspect particular a fost semnalat de Metcalf şi colab. (1979) care au arătat că stridia *Mya arenaria*, prin proprietăţile sale de bioacumulare a enterovirusurilor în organism, poate avea o acţiune de purificare a apelor în care se dezvoltă.

d) *Vegetale*. Pentru legumele care se consumă crude, cultivate pe terenuri irigate cu apă reziduală, s-a studiat experimental (Kott şi Fishelson, 1974) influenţa efluentului clorinat şi a celui neclorinat asupra poliovirusului tip 1. Cantitatea de virus găsită, în diferite condiţii de iradiaţie solară, la 6 ore de la contaminare, în comparaţie cu lotul martor este redată în tabelul 5.12. Autorii au scos în evidenţă influenţa netă a radiaţiei solare asupra gradului de inactivare a virusului.

Tabelul 5.12

Incidenţa izolărilor de enterovirusuri de pe spălăturile de legume (% din probe) tratate cu efluent clorinat şi, comparativ, neclorinat (Kott şi Fishelson, 1974)

Efluent	Incidenţa izolărilor (% din probe)	
	Lumină	Întuneric
Clorinat	1,6	8,5
Neclorinat	2,2	12,7

Konowalchuk şi Speirs (1974, 1975) au demonstrat experimental pe diferite legume că în condiţii de umiditate virusul Coxsackie B5 a supravieţuit un timp mai îndelungat, iar în condiţii de disecare a fost inactivat chiar din prima zi. Virusul se inactiva mai repede pe suprafeţele netede decît pe cele rugoase ale plantelor.

Pentru legumele conservate, Kostenbader şi Cliver (1977) au arătat prin expriment că în procesul de prelucrare a unor produse coloniale şi în procesul de uscare a cartofului, enterovirusurile polio şi Coxsackie A9 au fost distruse şi nu au putut fi regăsite în produsul final.

În ceea ce priveşte *fructele* un aspect particular îl constituie punerea în evidenţă a proprietăţilor antivirale a unor sucuri.

Astfel, Konowalchuk şi Speirs (1976 a, b) au studiat acţiunea antivirală a sucurilor de fragi, căpşuni, stafide, a mustului şi vinului. În tabelul 5.13 sînt redate experimentările care au demonstrat acţiunea inactivantă a unor băuturi şi infuzii asupra virusurilor Coxsackie, ECHO şi polio după 1 oră de contact la 4°C.

În continuarea cercetărilor, Konowalchuk şi Speirs (1977, 1978 a, b) au studiat efectul antiviral al unor sucuri de fructe şi de legume asupra virusurilor Coxsackie şi polio. Din 19 feluri de sucuri şi băuturi, acţiunea antivirală cea mai marcată au avut-o sucurile de struguri, mere şi ceaiul, care înhibau reproducerea virusului într-o proporţie de 99%, atît la pH natural cît şi la pH 7,0. Sucul de lămîie şi de cacao inhibau, la rîndul lor, poliovirusul într-o proporţie de 98% şi, respectiv, 92%. Sucurile de mere proaspete prezentau o acţiune antivirală mai pronunţată decît cele conservate. Acţiunea inactivantă a sucului de struguri a fost confirmată ulterior şi de alţi cercetători (Cliver şi Kostenbader, 1979).

Scanned with OKEN Scanner

John şi Mukundan (1978) au arătat, la rîndul lor, că infuzia de ceai (1 g frunze opărite cu 3 ml apă distilată clocotită) trecută prin filtre microbiene a inhibat multiplicarea virusurilor polio, Coxsackie B1 şi ECHO tip 7 şi 11 în proporţii variind între 78,00% şi 99,99%.

Tabelul 5.13

Cîteva experimente care au demonstrat acţiunea antivirală a unor sucuri (Konowalchuk şi Speirs, 1976b)

Produs	Specificaţie	pH	Diluţie	Virus izolat (% din cantitatea inoculată)		
				Coxsackie	ECHO	Polio
Stafide	Infuzie	4,4	—	—	56	45
		7,0	—	—	67	49
Must	—	3,3	Nediluat	3	<1	<1
			1 : 10	20	4	<1
			1 : 100	40	10	<1
		7,0	Nediluat	<1	<1	<1
			1 : 10	100	22	<1
			1 : 100	98	56	10
Vin	Roşu	3,5	Nediluat	98	31	10
			1 : 10	102	93	57
			1 : 100	83	101	95
		7,0	Nediluat	100	<1	<1
			1 : 10	97	66	17
			1 : 100	89	95	72
	Roz	3,5	Nediluat	82	54	31
			1 : 10	99	79	81
			1 : 100	95	89	96
		7,0	Nediluat	92	66	<1
			1 : 10	105	86	53
			1 : 100	93	95	96
	Alb	3,5	Nediluat	85	54	39
			1 : 10	90	90	78
			1 : 100	104	98	89
		7,0	Nediluat	97	71	29
			1 : 10	95	103	43
			1 : 100	101	101	85

În ţara noastră, Zavate şi colab. (1982) au studiat în condiţii experimentale durata de supravieţuire a enterovirusurilor (poliovirus tip 1, Coxsackie B3 şi ECHO tip 1) în apa minerală Poiana Negri, în infuzii de ceai chinezesc (*Thea sinensis*), flori de tei (*Tilia platyphyllos*), frunze de mentă (*Mentha piperita*), flori de muşeţel (*Marticaria chamomilla*), precum şi în cafea. În experimentare au fost puse în lucru două doze diferite de virus: doza mică = 100 DCP_{50} şi doza mare = 10 000 DCP_{50}, corespunzînd ipotetic unor situaţii de contaminare redusă şi masivă a băuturilor.

S-a constatat că în apa minerală, în infuzia de muşeţel şi în cafea enterovirusurile studiate au supravieţuit peste 20 de zile (timpul maxim

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.14

Testarea acţiunii inactivante a unor infuzii de plante medicinale şi a cafelei asupra enterovirusurilor (Zavate şi colab., 1982)

PRODUSUL	Diluţia	POLIOVIRUS												COXSACKIE B3												ECHO –1											
		Doză mică								Doză mare				Doză mică								Doză mare				Doză mică								Doză mare			
		Ore		Zile				Ore		Zile				Ore		Zile				Ore		Zile				Ore		Zile				Ore		Zile			
		4	24	5	10	15	20	4	24	5	10	15	20	4	24	5	10	15	20	4	24	5	10	15	20	4	24	5	10	15	20	4	24	5	10	15	20
Infuzie de ceai chinezesc	Infuzie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0
	10^{-1}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
	10^{-2}	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0
	10^{-3}	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0
Infuzie de tei	Infuzie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-1}	0	0	–	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+
	10^{-2}	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	–	0	+	+	+	+	+	+
	10^{-3}	+	+	0	–	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	+	+
Infuzie de mentă	Infuzie	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-1}	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
	10^{-2}	0	+	0	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
	10^{-3}	0	+	–	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Infuzie de muşeţel	Infuzie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cafea	Esenţă	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10^{-3}	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+
MARTOR VIRUS		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Probe: pozitive (reizolare) = + ; negative = 0, nelucrate = –

Scanned with OKEN Scanner

de urmărire). Dimpotrivă, infuziile de ceai chinezesc, de tei și de mentă au prezentat o acțiune inactivantă, posibil temporară, asupra aceloraşi enterovirusuri. S-a constatat o relație directă între concentrația infuziilor şi acțiunea lor inactivantă (tabelul 5.14). Tulpinile de poliovirus vaccinant au prezentat o sensibilitate mai mare față de acțiunea inactivantă a infuziilor în comparație cu virusurile Coxsackie şi ECHO, ceea ce ridică problema unei eventuale influențe nefavorabile asupra eficienței vaccinării antipoliomielitice în cazul în care vaccinul este administrat concomitent cu una din infuziile studiate.

Din tabel se mai poate observa că acțiunea inactivantă a infuziilor a fost în unele situații inconstantă, aşa cum este cazul infuziei de ceai chinezesc în diluție de 10^{-1} pentru virusul ECHO tip 1 şi Coxsackie B3, a infuziei de mentă în diluție de 10^{-1} pentru poliovirus în doză mică etc. Virusurile aparent inactivate în primele ore sau zile au putut fi reizolate la intervale mai mari de contact, la 15 sau 20 de zile.

Acest fenomen poate fi explicat în primul rînd prin faptul că în realitate virusurile nu sînt distruse în totalitate ci îşi reduc infectivitatea în proporții variind între 79,00 şi 99,99%, ratele de inactivare putind fi cunoscute numai atunci cînd se lucrează prin metoda plajelor. În al doilea rînd, se poate presupune că pierderea infectivității se datorează formării de complexe dintre unele substanțe din infuzii şi proteinele virale, complexe care sub influența anumitor factori (modificarea pH-ului, durata incubării, concentrația componentelor active etc.) se pot disocia ducind la reactivarea virusului, aşa cum aceasta a fost demonstrat pentru vinuri şi must (Konowalchuk şi Speirs, 1976b). Nu se cunoaşte încă cu precizie care sînt factorii responsabili de acțiunea antivirală a sucurilor respective, ea fiind atribuită de diferiți cercetători, fenolilor, acidului ascorbic, galic, cofeinei, vanilinei etc.

Dată fiind complexitatea compoziției diferitelor sucuri de fructe şi plante, pentru descifrarea acestui aspect s-au instituit experimentări cu elementele individuale care intră în componența lor. Astfel, Jablonski şi Polz (1980) au studiat acțiunea guanidinei, saponinei şi a taninului asupra virusului ECHO tip 9 iar Salo şi Cliver (1978) au demonstrat acțiunea inactivantă a acidului ascorbic şi a bisulfitului de sodiu asupra virusurilor polio, Coxsackie A9 şi ECHO 7. S-a constatat că rata de inactivare a fost mai crescută la temperatură mai mare şi la pH mai scăzut, existînd diferențe de la un tip antigenic de enterovirus la altul. În ceea ce priveşte mecanismul de inactivare s-a constatat scăderea infectivității ARN, modificări ale capsidei virale şi pierderea proprietăților hemaglutinante.

În general, după experții O.M.S. (* * * 1977, 1979), metodele de prelucrare şi distribuție a alimentelor pot avea un efect hotărîtor asupra poluării virale a produsului final. În primul rînd trebuie să menționăm că procedeele moderne de conservare a alimentelor la temperaturi joase permit supraviețuirea celor mai multe virusuri timp de luni şi chiar ani de zile, ceea ce constituie un factor favorizant în transmiterea infecțiilor virale prin alimente. Sărarea poate reduce contaminarea, dar totuşi unele virusuri sînt rezistente la concentrații relativ crescute folosite pentru conservarea alimentelor. În sfîrşit, din cercetările experimentale menționate a reieşit că pentru inactivarea virusurilor prezente în diferite alimente se impun o serie de măsuri practice care constau în primul rînd din inactivarea termică corectă iar pentru produsele care se consumă crude din inactivarea cu raze gama sau cu etilenoxid, aşa cum s-a propus recent în lite-

Scanned with OKEN Scanner

ratura de specialitate (Mayr, 1980; Cliver, 1981). În plus, acţiunea inactivantă a diferitelor substanţe sugerează, de asemenea, ideea utilizării lor pentru prevenirea transmiterii virusurilor prin alimente.

5.3.6. PROGRAME DE CERCETARE, NORME, STANDARDE DE VIROLOGIE ALIMENTARĂ

În anul 1967, Comitetul de experţi O.M.S. pentru Microbiologie alimentară a recomandat extinderea cercetărilor prin includerea investigaţiilor care să stabilească rolul virusurilor în transmiterea unor infecţii prin alimente. În consecinţă, a fost elaborat un program O.M.S. de virologie alimentară care în cei peste 10 ani s-a dezvoltat şi consolidat printr-o serie de cercetări şi consultări.

În anul 1979, Programul O.M.S. de virologie alimentară avea următoarele obiective: promovarea şi coordonarea cunoştiinţelor asupra transmiterii virusurilor prin alimente în scopul de a preveni şi combate bolile virale datorate alimentelor, culegerea şi cartarea mecanică a datelor privind cauzele de boală, detectarea în laborator a virusurilor, cunoaşterea stabilităţii lor în diferite alimente, studiul particularităţilor şi proprietăţilor virusurilor implicate în transmiterea alimentară, cunoaşterea laboratoarelor şi a persoanelor care se ocupă de virologie alimentară, livrarea de tulpini de referinţă, coordonarea studiilor şi instructarea specialiştilor asupra tehnicilor de lucru în domeniul virologiei alimentare.

Pentru informarea şi coordonarea investigaţiilor de virologie alimentară au fost desemnate de către O.M.S. două colective:

— Institutul de cercetări alimentare din Madison, Wisconsin (S.U.A.) care deţine informaţiile privind epidemiile de origine alimentară; incidenţa înregistrată şi presupusă a virusurilor în alimente; metode de concentrare şi detectare; persistenţa şi inactivarea virusurilor în alimente;

— Institutul de cercetări veterinare din Brno (Cehoslovacia) care centralizează informaţiile privind virusurile implicate în transmiterea pe cale alimentară; structura particulei virale; gazdele animale ale virusului; organele în care se localizează virusul; propagarea infecţiei; distribuţia geografică; metodele de diagnostic de laborator; inactivarea virusurilor.

În ceea ce priveşte indicatorii de poluare virală a alimentelor, aceştia au fost puţin studiaţi iar propunerile făcute, privind prezenţa de bacteriofagi de exemplu, nu au rezistat din punctul de vedere al aplicării lor în practică.

În încheiere, trebuie să menţionăm că transmiterea pe cale alimentară a enterovirusurilor este de fapt un proces complex cu numeroase verigi la care participă diferite elemente ale mediului extern, cum ar fi apa, solul, temperatura, umiditatea, prezenţa insectelor etc. Se impun măsuri de profilaxie care constau din igienizarea centrelor populate, controlul sanitar al întreprinderilor de alimentaţie publică, controlul normelor sanitare în fermele de lapte, igienă individuală şi la locul de muncă, măsuri valabile în toate situaţiile de poluare biologică a mediului ambiant.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

AIZEN M. S., PILLE E. P. (1972), *Experimentalnoe izucenie vijtvaemosti necotorih virusov na measnih productah*, Ghigh. Sanit., *3*, 28—30.

AIZEN M. S., PILLE E. P. (1973), *Ispolzovanie polietilenglicolea dlea vliavlenia virusov v pişcevih productah*, Lab. Delo, *9*, 550—552.

AIZEN M. S., PILLE E. P. (1976), *Roli pişcevih productov v rasprostranenii virusnih infecţii*, J. Microbiol. Epidemiol., Immunol., *4*, 12—17.

AIZEN M. S. (1978), *Enterovirusi v pişcevih productah: metodiceskie aspecti i epidemiologhiceskoe znacenie*. In: Tez. dokl. Simpoz. i zasedania Vses. probl. Comis. Epidemiol., klinika, diagnost. i. profilact. infecţ. boleznei, Tallin, pp. 325—327.

BABOV D. M., GUBERNKO L. I., MUROMTEVA A. A., IAROŢCAIA N. E. (1971), *Necotorie zaconomernosti ţirculaţii enterovirusov vo vneşnei srede i sredi naselenia Odessi*, Ghigh. Sanit., *3*, 54—57.

BÂRZU A., ZAVATE O., BÂRZU N. (1970), *Posibilitatea vehiculării virusului Coxsackie prin brînzeturile proaspete şi sărate*, Igiena, **19**, *6*, 345—352.

BONDARENKO V. I., GRIGORIEVA L. V. (1975), *Videlienie enterovirusov s poverhnosti ovoşcei i fructov*, Microbiol. J. **37**, *2*, 244—247.

CHANG P. W., LIU O. C., MILLER L. T., LI S.M. (1971), *Multiplication of human enteroviruses in Northern Quahogs*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., *136*, 1380—1384.

CLIVER D. O., GRINDROD J. (1969), *Surveillance methods for viruses in food*, J. Milk. Food Techn., **32**, 421—425.

CLIVER D. O., KOSTENBADER J.K.D., VALLENAS M. R. (1970), *Stability of viruses in low moisture foods*, J. Milk Food. Techn., **33**, 484—491.

CLIVER D. O., KOSTENBADER K. D. (1979), *Antiviral effectiveness of grape juice*. J. Food Protect., **42**, *2*, 100—104.

CLIVER D. O. (1981), *Gefahren einer virusinfektion durch Fleish*, Fleischwirthschaft, **61**, *3*, 432—434.

DENIS F. A. (1974), *Les virus pathigènes pour l'homme dans les eaux de mer et dans les mollusques*, Méd. Malad. infect., **4**, *6* bis, 325—326; 329—334.

DI GIROLAMO R., WICZYNSKI L., DALEY M., MIRANDA F., VIEHWEGER C. (1972), *Preliminary observation on the uptake of poliovirus by west-coast shore crabs*, Appl. Microbiol., **23**, *1*, 170—171.

DI GIROLAMO R., LISTON J., MACTCHES J. R. (1975), *Uptake and elimination of poliovirus by west coast oysters*, Appl. Microbiol., **29**, *2*, 260—264.

ELLENDER R. D., COOK D. W., SHELADIA V. L., JOHNSON R. A. (1980), *Enterovirus and bacterial evaluation of Mississipi oysters*, Gulf Res. Repts., **6**, *4*, 371—376.

EYLES M. I. (1978), *Viruses in food*, Food Techn. Austral., **30**, *8*, 291—294.

FINANCE C., VILLEVAL F., BLOCK J. C., SCHWARTZBROD L. (1981), *Improved method for virological analysis of food*, Appl. environ. Microbiol., **42**, *1*, 176—179.

FILPPI J. A., BANWART G. I., (1974), *Effect of the fat content of ground beef on the heat inactivation of poliovirus*, J. Food. Sci., **39**, *5*, 865—868.

GOYAL S. M., GERBA C. P., MELNICK J. L. (1979), *Human enteroviruses in oysters and their overlying waters*, Tex. J. Sci., **31**, *2*, 198—201.

GRIGORIEVA L. V., OMELIANET T. G., STAROVOITOVA T. V. (1966), *Razruşenie bacteriinoi i virusnoi florî na ovoşcinh culturah*, Vraceb. Delo, *11*, 78—81.

HEJKAL T. W., GERBA C. P. (1980), *Uptake and survival of viruses in the blue crab, Callinectes sapidus*, Abst. Ann. Met. Amer. Soc. Microbiol., Washington D.C., 210.

HERRMANN J. E., CLIVER D. O. (1968), *Methods for detecting food-borne enterovirus*, J. appl. Microbiol., **16**, 1564—1569.

JABLOŃSKI L., POLZ M. (1980), *Wplyw taniny, saponiny i guaniditny na replikajie wirusa ECHO 9 i jego mutantow*, Med. dośw Mikrobiol., **32**, *2*, 121—125.

JOHN J. T., MUKUNDAN P. (1978), *Antiviral property of tea*, Curr. Sci., **47**, *5*, 159—160.

JOHNSON K. M., COOPER R. C., STRAUBE D. C. (1981), *Procedure for recovery of enteroviruses from the Japanese cockle Tapes Japonica*, Appl. environ. Microbiol., **41**, *4*, 932—935.

KALITINA T. A. (1969), *Izucenie vijtvaemosti enterovirusov v molocinih productah*, J. Microbiol. Epidemiol., Immunol., *7*, 61—64.

KALITINA T. A. (1971), *Vijtvaemosti virusa poliomielita i necotorih drughih chişecinih virusov v tvoroghe*, Vopr. Pitania, **30**, *2*, 78—82.

KALITINA T. A. (1972), *Metod videlenia enterovirusov iz miasa*, Vopr. Pitania, **31**, *4*, 80—83.

KALITINA T. A. (1975a), *Experimentalnie materialî virusologhicescovo isledovania pasterizovanovo moloca*, Vopr. Pitania, **34**, *4*, 69—73.

KALITINA T. A. (1975b), *K metodu videlenia enterovirusov iz miasa*, Vopr. Pitania, **34**, *6*, 52—55.

Scanned with OKEN Scanner

KALITINA T. A. (1978), *Razrabotca metoda conţentraţii enterovirusov pri virusologhiceschih issledovaniah miasa*, Vopr. Virosol., *5*, 621–625.
KAZANŢEVA V. A., DROZDOV S. G., OSEROVICI A. M., AIZEN M. S., KASINŢEVA I. A. (1977), *Perspectivi compexnovo izucenia rasprostranienia enterovirusov v vneşnei srede*, Tezisi docl. XVI Vses. siezda microbiologov i epidemiologov, Ulianovsk, 165–166.
KAZANŢEVA V. A., ZARUTKAIA V. G., STEPANIATOV V. E., KODKIND G. H., DROZDOV S. G., OSEROVICI A. M., BORISOV A. T. (1978), *Oţenka effectivnosti rejima pasterizaţii v otnoşenii kişecinth virusov*, Ghigh. Sanit. *10*, 90–93.
KEFFORD B., BORLAND R., SINCLAIR A. J. (1979), *Viral and Coxiella contamination of milk*, Austral. J. Dairy Technol., **34**, *3*, 102–105.
KISELEVA L. F., (1971), *Vţjtvaemosti virusov poliomielita, ECHO i Coxsackie v necotorih productah pitania*, Vopr. Pitania, **30**, *6*, 58–61.
KONOWALCHUK J., SPEIRS J. (1973), *An efficient ultrafiltration method for enterovirus recovery from ground beefs*, Canad. J. Microbiol., **19**, 1054–1056.
KONOWALCHUK J., SPEIRS J. I. (1974), *Recovery of Coxsackie B5 from stored lettuce*, J. Milk Food Technol., **37**, *3*, 132–134.
KONOWALCHUK J., SPEIRS J. I. (1975), *Survival of enteric viruses on fresh vegetables*, J. Milk Food Tecnol., **38**, *8*, 469–472.
KONOWALCHUK J., SPEIRS J. I. (1976a), *Antiviral activity of fruits extracts*, J. Food Sci., **41**, 1013–1017.
KONOWALCHUK J., SPEIRS J. I. (1976b), *Virus inactivation by grapes and wines*, Appl. Environ. Microbiol., **32**, 757–763.
KONOWALCHUK J., SPEIRS I. I. (1977), *Virus detection on grapes*, Canad. J. Microbiol., **23**, *9*, 1301–1303.
KONOWALCHUK J., SPEIRS I. I. (1978a), *Antiviral effect of commercial juices and beverages* Appl. environ. Microbiol., **35**, *6*, 1219–1220.
KONOWALCHUK J., SPEIRS I. I. (1978b), *Antiviral effect of apple beverages*, Appl. environ. Microbiol., **36**, *6*, 798–801.
KOSTENBADER K. D., CLIVER D. O. (1973), *Filtration methods for recovering enteroviruses from foods*, Appl. Microbiol., **26**, *2*, 149–154.
KOSTENBADER K. D., CLIVER D. O. (1977), *Quest for viruses associated with our food supply*, J. Food Sci., *42*, *5*, 1253–1257.
KOSTENBADER K. D., CLIVER D. O. (1979), *Purchased cell cultures for detecting foodborne viruses*, J. Food Protect. **42**, *11*, 888–889.
KOTT H., FISHELSON L. (1974), *Survival of enteroviruses on vegetables irrigated with chlorinated oxidation pond effluents*, Isr. J. Technol., **12**, *5*, 290–297.
LABIE C. (1979), *Virus et denrées alimentaires d'origine animale*, Rev. Méd. vet., **130**, *11*, 1427–1440 şi 1443–1458.
LANDRY E. F., VAUGHN J. M., VICALE T. J. (1980), *Modified procedure for extraction of poliovirus from naturally infected oysters using Cat-Floc and beef extract*, J. Food Protect., **43**, *2*, 91–94.
LARKIN E. P., TIERNEY J. T., SULLIVAN R., PEELER J. T. (1975), *Collaborative study of the glass wool filtration method for the recovery of virus inoculated into ground beef*, J. Ass. Offic. anal. Chem., **58**, *3*, 576–578.
LARKIN E. P., TIERNEY J. T., SULLIVAN R. (1976), *Persistence of virus on sewage irrigated vegetables*, J. environ. Eng. Div. Proc. amer. Soc. Eng., **102**, *1*, 29–35.
LARKIN E. P., METCALF T. G. (1980), *Cooperative study of methods for the recovery of enteric viruses from shellfish*, J. Food Protect., **43**, *2*, 84–86.
MAYR A. (1980), *Viren in Lebensmitteln*, Umschau Wiss. Techn., **80**, *13*, 394–400.
METCALF T. G., MULLIN B., ECKERSON D., MOULTON E., LARKIN E. P. (1979), *Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the softshelled clam Mya arenaria*, Appl. environ. Microbiol., **38**, *2*, 275–282.
METCALF T. G., MOULTON E., ECKERSON D. (1980a), *Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish*, Appl. environ. Microbiol., **39**, *1*, 141–152.
METCALF T. G., ECKERSON D., MOULTON E. (1980b), *A method for recovery of viruses from oysters and hard and saft shell clams*, J. Food Protect., **43**, *2*, 89–90.
OŞEROVICI A. M., KASOVNIKOVA G. S. (1967), *Poliomielit i virusnii enţefalit*. In: Materiali problem comisii Akad. Med. Nauk SSSR, 1, 90–92.
OŞEROVICI A. M., KAZANŢEVA V. A., AIZEN M. S. (1981), *Enterovirusi v molocinih productah*. In: *Virusi i virusnie infecţii celoveka*, Moscova, p. 24–25.
SADOVSKI A., FATTAL B., KATZENELSON E. (1974), *Evaluation of methods for a quantitative estimation of microbial contamination of sewage irrigated vegetables*, Proc. V^th Sci. Conf. Israel Ecological Society, Tel-Aviv, D, pp. 119–130.

SADOVSKI A.Y., FATTAL B., GOLDBERG D., KATZENELSON E., SHUVAL H. I. (1978), *High level of microbial contamination of vegetable irrigated with wastewater by the drip method*, Appl. environ. Microbiol., **36**, *6*, 824—830.
SALO R. J., CLIVER D. O. (1978), *Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite*, Appl. environ. Microbiol., **36**, *1*, 68—75.
SOBSEY M. D., WALLIS C., MELNICK J. L. (1975), *Development of a simple method for concentrating enteroviruses from oysters*, Appl. Microbiol., **29**, *1*, 21—26.
SOBSEY M. D., CARRICK R. J., JENSEN H. R. (1978), *Improved methods for detecting enteric viruses in oysters*, Appl. environ. Microbiol., **36**, *1*, 121—128.
SULLIVAN R., FOSCOLITIS A., READ R. (1970), *Method for isolating viruses from ground beef*, J. Food Sci., **35**, 624—626.
SULLIVAN R., MARINELL R. M., LARKIN E. P., READ R.B.J. (1975), *Inactivation of poliovirus 1 and Coxsackie B2 in broiled hamburgers*, J. Milk Food Tecnol., **38**, *8*, 473—475.
TIERNEY J. T., LARKIN E. P. (1978), *Potential sources of error during virus thermal inactivation*, Appl. environ. Microbil., **36**, *3*, 432—437.
TIERNEY J. T., FASSOLITIS A., VAN DONSEL D., RAO V. C., SULLIVAN R., LARKIN E. P. (1980), *Glass wool-hydroextraction method for recovery of uman enteroviruses from shellfish*, J. Food Protect., **43**, *2*, 102—104.
TIRON S., COTOR F., ZAVATE O. (1980), *Investigații privind supraviețuirea enterovirusurilor în lapte*. In vol.: Rez. Ses. șt. an. Inst. Igienă și Sănătate Publică Iași, 12—13 febr., p. 52.
VAUGHN J. M., LANDRY E. F., VICALE T. I., DAHL M. C. (1979), *Modified procedure for the recovery of naturally accumulated poliovirus from oysters*, Appl. environ. Microbiol., **38**, *4*, 594—598.
VAUGHN J. M., LANDRY E. F., VICALE T. J., DAHL M. C. (1980), *Isolation of naturally occurring enteroviruses from a variety of shellfish species residing in Long Island and New Jersey marine embayments*, J. Food Protect., **43**, *2*, 95—98.
ZAVATE O., COTOR F., IVAN A. (1979), *Rolul alimentelor în transmiterea unor boli virale*, Igiena, **28**, *2*, 105—110.
ZAVATE O., TIRON S., COTOR F. (1982), *Preliminary data on the survival length of enteroviruses in nonalcoholic beverages. Inactivating action of medicinal herb infusions*, Rev. roum. Méd. Virol., **33**, *3*, 000—000.
* * * (1977), *The World Health Organisation's Food Virology Programme*, Prepared by the Veterinary Public Health Division of Communicable Diseases, October, Geneva.
* * * (1978), *Banque de données sur le virus dans les aliments*, Chronique O.M.S., **32**, *1*, 8.
* * * (1979a), *U. S. Dept. HEW. Aseptic meningitis outbreak at a military installation in Pennsylvania*, CDC Pub. No. 79—8231, 11.
* * * (1979b), *The World Health Organization's Food Virology Programme*, October.
* * * (1980), *Comportement des mollusques et crustacés et contamination*, Chronique O.M.S., **34**, *2*, 85.

5.4. ENTEROVIRUSURILE ÎN AER

Prezența în aer a virusurilor, in general, și a enterovirusurilor, în special, a constituit în ultimii ani o preocupare mai intensă a cercetătorilor interesați să cunoască rolul căii aeriene în transmiterea infecțiilor, durata de supraviețuire și posibilitățile de inactivare a virusurilor în aer, metodele de izolare a acestora etc. (* * * 1979; Steirmann, 1979; Feachem și colab. 1981).

5.4.1. CĂILE POSIBILE DE TRANSMITERE AERIANĂ A ENTEROVIRUSURILOR

Rolul aerului în vehicularea infecțiilor virale de tip respirator este unanim recunoscut și relativ mai larg studiat. În ceea ce privește enterovirusurile, transmiterea aeriană se poate produce prin două modalități (fig. 5.10): direct de la excretor la receptor prin exsudat nazofaringian răspîndit sub

formă de aerosoli prin tuse, strănut sau vorbire şi, indirect, prin aerosoli conţinînd enterovirusuri din materii fecale care au contaminat mediul ambiant şi anume suprafeţele, solul şi apele reziduale. De remarcat că eliminarea enterovirusurilor pe cale intestinală este masivă şi de lungă durată (săptămîni sau chiar luni) iar rezistenţa lor faţă de agenţi fizici şi chimici

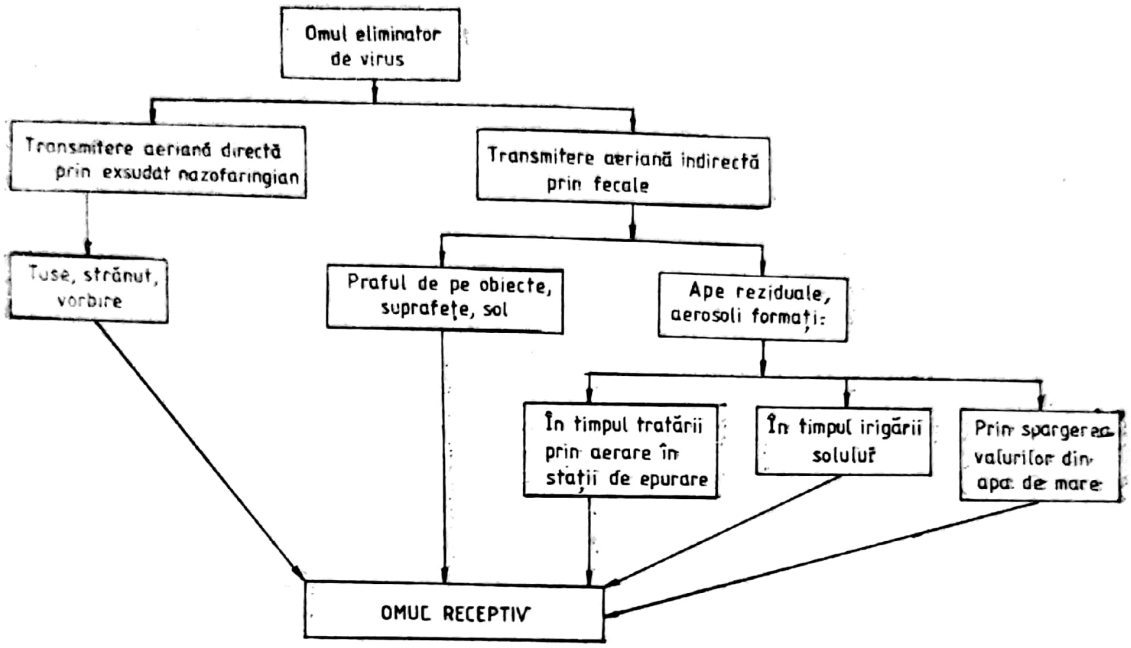


Fig. 5.10 — Modalităţi de transmitere a enterovirusurilor pe cale aeriană.

relativ crescută, ceea ce favorizează transmiterea indirectă a infecţiei (Teodorovici, 1978).

Transmiterea directă prin tuse, strănut sau vorbire este de scurtă durată, fiind maximă în primele zile de boală.

Transmiterea indirectă se poate realiza fie prin inhalarea de aerosoli odată cu praful de pe obiecte, suprafeţe sau sol contaminat cu enterovirusuri provenite din exsudat nazofaringian sau din fecale, fie prin aerosoli din ape reziduale, formaţi în timpul procesului de aerare în staţiile de epurare, în timpul irigării solurilor cultivate, în timpul folosirii jetului de apă în W.C.-uri sau prin acţiunea valurilor şi vîntului asupra apei de mare în care se devarsă ape reziduale (fig. 5.10).

Răspîndirea enterovirusurilor eliminate prin materii fecale în mediul ambiant pe suprafeţe în locuinţe, colectivităţi de copii, internate, şcoli etc. este astăzi bine demonstrată aşa cum vom arăta în capitolul 5.5. De pe suprafeţe, virusurile pot fi antrenate în aer sub formă de praf în special cu ocazia efectuării curăţeniei (măturat, şters praful, scuturat). Apariţia enterovirusurilor în aer mai poate fi determinată de uscarea materiilor fecale pe sol, de transformarea lor în particule fine de praf care antrenate de curenţii de aer pot să rămînă mult timp în suspensie sau să fie transportate la distanţă.

O altă sursă indirectă de enterovirusuri în aer este reprezentată de aerosolii proveniţi din apele reziduale în uzinele de epurare cu ocazia aerării sedimentelor sau a aspersiunii apelor reziduale asupra filtrelor biologice, etape ale procesului de denocivizare a acestora. Aerosolii contaminaţi prezintă un pericol pentru muncitorii care lucrează în staţiile de epurare respective şi pentru populaţia din jur în cazul în care sînt împrăştiaţi prin acţiunea vîntului.

Scanned with OKEN Scanner

În procesul de formare a picăturilor la suprafața lichidelor aerate sînt antrenate materiile organice și microorganismele. Ca rezultat, particulele de aerosoli pot să conțină adesea concentrații de bacterii sau de virusuri de peste 100 de ori mai mari decît cele din apă (Blanchard și Syzdek, 1974). Virusurile care se încorporează în acești aerosoli fac parte din grupul celor enterale cunoscute prin generarea unor afecțiuni epidemice ca poliomielita, meningita aseptică, conjunctivita, la care se adaugă hepatita virală, gastroenteritele și altele, concentrația lor în aerosoli fiind suficientă pentru a determina infecția la om (Slote, 1976 ; Melnick și colab., 1978).

În ceea ce privește posibilitatea transmiterii enterovirusurilor cu ocazia irigațiilor prin aspersiune, practicate în mod curent pentru răspîndirea apelor uzate pe sol cultivat, s-a stabilit că 0,1 pînă la 1% din lichid, în raport cu tipul de pulverizator, presiunea și viteza vîntului, este transformat în aerosoli (Parker, 1977). Aceștia pot parcurge distanțe considerabile care ating chiar 1 200 m ca rază și 150 m în înălțime de la locul producerii lor (Bausum și colab., 1976). Efectuînd un calcul teoretic, Sorber și colab. (1974) au arătat că o persoană tînără și sănătoasă, lucrînd în perimetrul irigat poate inhala 240 de virusuri în 10 minute în cazul unei contaminări puternice (6 000 virusuri/l), în timp ce la o distanță de 200 de metri de perimetrul stropit în condițiile unei contaminări slabe (10 virusuri/l), riscul de a inhala virusuri scade la 0,0006 virusuri în 10 minute.

Apa de mare, în care sînt deversate apele reziduale netratate, transformată în aerosoli în timpul spargerii valurilor sau a circulației ambarcațiunilor, poate să constituie de asemenea un risc pentru populația din zonele riverane sau din stațiunile balneare și turistice maritime aglomerate, chiar dacă oamenii nu se expun la o contaminare directă prin baie. Bulele din valurile mării adsorb, concentrează și transportă la distanță virusurile din apa mării transformate în aerosoli printr-un proces analog cu cel de ridicare în aer a bulelor industriale care concentrează minereuri metalice, enzime sau cristale organice fin divizate. Astfel, Baylor și colab. (1977 a, b) au arătat că după injectare experimentală în val a fagilor T_2 și T_4 luați ca indicator, cantitatea de virus (colifagi) din bule a fost de 100—200 de ori mai mare în comparație cu cea din apă.

În interiorul locuințelor și colectivităților, virusurile se pot răspîndi prin aerosoli cu ocazia folosirii W.C.-urilor cu jet de apă. Experimental Gerba și colab. (1975) au însămînțat într-o cupă de toaletă o cantitate de 10^8 poliovirus și au constatat că virusul a putut fi recuperat într-o proporție de 84% din cantitatea inițială. Experiențe ulterioare, citate de Feachem și colab. (1981), au dovedit că bacteriofagii au rămas în aer un timp relativ îndelungat după utilizarea jetului de apă de la W.C., putînd contamina în acest mod persoanele ce intră ulterior în încăpere. După 2 ore, 94% din cantitatea inițială de virus s-a depus pe suprafețele din baie iar restul de 6% abia peste 4 ore de la producerea aerosolilor.

După Karpuhin și colab. (1968), aerosolii se pot împărți convențional în trei stări fizice sau faze:

(a) *faza de picături mari* de mucozități și salivă proiectate prin tuse în aer sau provenite din fecale în cazul manevrelor de aspersiune sau aerare; aceste picături, avînd diametrul de peste 100 de microni, constituie un sistem fazic instabil și se împrăștie pe o rază limitată în jurul sursei de pulverizare datorită sedimentării lor rapide;

(b) *faza de picături-nuclei*, formate datorită evaporării rapide a părţii lichide, avînd acelaşi conţinut biologic şi un diametru sub 100 de microni; particulele nucleare se află într-o strînsă corelaţie cu factorii fizici şi electrochimici ai mediului ambiant constituind în ansamblu un sistem coloidal stabil; durata persistenţei particulelor din această fază în aer şi posibilităţile de a fi transportate la distanţe mari imprimă acestora un rol important în vehicularea pe cale aeriană a infecţiilor virale;

(c) *faza de praf fin* din locuinţe sau de pe sol la care sînt aderate fazele precedente sedimentate, cu acelaşi conţinut biologic; aerosolii din această fază se ridică uşor la curenţii de aer şi rămîn un timp în suspensie sedimentîndu-se în cele din urmă pe suprafeţele din mediul ambiant care la rîndul lor pot deveni surse indirecte de infecţie pentru cei din jur; particulele uscate de aerosoli, sedimentate, se pot ridica din nou în aer în timpul efectuării curăţeniei şi să fie transportate cu curenţii de aer, întreţinînd astfel circulaţia continuă a enterovirusurilor în interiorul încăperilor.

După experţii O.M.S. (*** 1979), fiinţele umane pot să fie infectate prin aerosoli conţinînd bacterii sau virusuri patogene, în special prin inhalarea particulelor măsurînd 0,2—2,0 microni, care pătrund în alveolele pulmonare. Picăturile mai mari de 2—5 microni sînt evacuate prin acţiune ciliară dar pot să treacă în aparatul digestiv şi prin ingestie să determine, la rîndul lor, infecţia persoanelor receptive.

Posibilitatea transmiterii enterovirusurilor pe cale aeriană a fost demonstrată categoric, prin experimentările efectuate cu virus Coxsackie A21 pe voluntari de către autorii americani Couch şi colab. (1970). Un număr de 39 de voluntari fără anticorpi serici faţă de virusul Coxsackie A21 a fost împărţit în două subgrupe: (A) de 20 şi (B) de 19 persoane. Aceştia au fost cazaţi într-o baracă despărţită în două părţi cu o plasă dublă de sîrmă, fără posibilitate de contact direct între cele două subgrupuri. Pulverizarea prealabilă a încăperii cu fluoresceină a demonstrat dispersia uniformă a acestei substanţe în cele două jumătăţi ale spaţiului. Din subgrupul (A), 10 voluntari au fost infectaţi cu virus Coxsackie A21 pe cale aeriană iar ceilalţi 10 au rămas în contact direct cu cei inoculaţi. Voluntarii din subgrupul (B) au fost cazaţi în cealaltă jumătate a încăperii avînd un contact indirect, numai pe cale aeriană cu cei din subgrupul (A). Ambele subgrupuri au fost urmărite timp de 26 de zile în care perioadă s-a controlat zilnic prezenţa enterovirusului în exsudatul nazofaringian şi starea sănătăţii. Rezultatele acestui experiment au relevat: diseminarea rapidă şi uniformă a aerosolilor virali în ambele compartimente ale barăcii demonstrată prin evidenţierea virusului în probele de aer, infectarea tuturor voluntarilor demonstrată prin izolarea virusului din exsudat nazofaringian şi prin seroconversie şi apariţia de îmbolnăviri febrile sau afebrile ale căilor respiratorii la unii dintre voluntari (tabelul 5.15).

5.4.2. PREZENŢA ENTEROVIRUSURILOR ÎN AER

Studiile de teren privind prezenţa virusurilor în aerosoli şi riscurile care decurg pentru sănătatea omului sînt încă limitate ca număr. Prezenţa enterovirusurilor în aerosoli depinde de rezistenţa lor la acţiunea inactivantă a agenţilor fizici şi chimici ai mediului extern, de intensitatea radiaţiilor solare, variaţiile de temperatură a aerului, gradul de umiditate rela-

Scanned with OKEN Scanner

tivă, formele de ionizare a aerului, prezenţa substanţelor toxice de provenienţă industrială etc.

Încercări de a evidenţia enterovirusurile în aer au fost făcute, atît pentru aerul din încăperi cît şi pentru cel comunal în zonele cu risc crescut.

Tabelul 5.15

Afecţiunile respiratorii înregistrate la voluntarii inoculaţi cu virus Coxsackie A21 şi la contacţii lor (Couch şi colab., 1970)

Subgrup de voluntari	Nr. voluntari	Nr. îmbolnăviţi	Afecţiuni ale căilor respiratorii		
			superioare		inferioare
			Afebrile	Febrile	Febrile
Inoculaţi subgrup A	10	8	4	0	4
Contacţi subgrup A	10	5	2	3	0
Contacţi subgrup B	19	7	3	2	2
Total	39	20	9	5	6

În încăperi, Dmitreva (1977) a reuşit să pună în evidenţă tulpini citopatogene în 2 din cele 20 de probe de aer recoltate în saloanele unui spital.

În ceea ce priveşte aerul comunal, enterovirusurile au fost puse în evidenţă în aerosolii formaţi în staţiile de epurare în timpul tratării apelor uzate, pînă la 1 200 de metri distanţă, iar în aerosolii formaţi în timpul aspersiunii solurilor irigate, distanţe mult mai mari de la sursă (Parker, 1977). Teltsch şi Katzenelson (1978) au găsit germeni coliformi la 350 m, salmonele la 60 m şi enterovirusuri la 40—100 m distanţă de cîmpurile irigate prin pulverizarea apelor uzate. Aproximativ 30% din particulele de aerosoli erau destul de mici (sub 5 microni) pentru a fi inhalate. Deoarece aerosolii dispersaţi prin pulverizarea apelor uzate pot fi antrenaţi de curenţii de aer şi transportaţi la distanţe mari, chiar pînă la cartiere periferice ale centrelor urbane, constituind un pericol potenţial de apariţie a unor epidemii de natură enterovirală, se impune instituirea unui control virusologic sanitar al aerului comunal în zonele cu risc crescut (Teltsch şi colab., 1980).

Un studiu retrospectiv asupra riscurilor posibile pentru sănătate, asociate cu pulverizarea apelor uzate cu ocazia irigaţiilor a fost iniţiat în Israel de către Katzenelson şi colab. (1976). S-a arătat că printre populaţia din 77 de unităţi agricole care practicau irigarea prin pulverizare utilizînd efluenţi de ape uzate din bazinele de oxidare după 3—7 zile de retenţie, incidenţa unor boli digestive ca febra tifoidă, salmoneloze, shigheloze şi hepatita infecţioasă a fost de 2—4 ori mai mare în comparaţie cu cea a populaţiei din alte 130 de unităţi agricole martor care nu utilizau ape uzate pentru irigaţie. Aceste diferenţe se constatau numai în perioada de vară şi nu în cea de iarnă cînd nu se practicau irigaţiile. În ceea ce priveşte infecţiile respiratorii, streptococice, tuberculoza ş.a., nu au fost înregistrate diferenţe de morbiditate între populaţia din unităţile agricole care practicau sau nu irigaţia. Distanţa dintre zonele rezidenţiale şi zonele irigate a variat între 300 şi 3000 m. În concluzie, autorii au precizat că deşi din studiul lor reiese că supramorbiditatea prin boli digestive poate

Scanned with OKEN Scanner

fi asociată cu transmiterea prin aerosoli, agenţii patogeni respectivi ar putea să fie aduşi în comunitate şi în alt mod, pe veşminte sau corpul muncitorilor din zonele irigate, şi transmişi prin contact direct persoanelor receptive.

Acelaşi colectiv (Teltsch şi Katzenelson, 1978) a urmărit corelaţia dintre concentraţia unor agenţi microbieni şi a enterovirusurilor în apele reziduale şi frecvenţa detectării lor în aerosoli. S-a precizat, de exemplu, că izolarea bacteriilor coliforme din aerosoli a fost posibilă numai atunci cînd concentraţia acestora a depăşit 10^3/ml.

S-a constatat un raport direct dintre prezenţa şi durata de supravieţuire a virusurilor aerosolizate şi umiditatea relativă şi radiaţia solară. Astfel, frecvenţa detectării virusurilor din aerosoli formaţi prin aspersiunea terenurilor în timpul nopţii a fost de 100 de ori mai mare faţă de cea din timpul zilei cînd intervine radiaţia solară directă şi dispersă (Bausum şi colab., 1976). Viteza vîntului contribuie la transportarea virusurilor la distanţă. De exemplu, virusul ECHO tip 7 a fost izolat în 4 din 12 probe de aer recoltate la 40 m distanţă de la terenul aspersat (Teltsch şi Katzenelson, 1978) iar colifagul f2 pînă la 563 m faţă de un teren irigat cu ape uzate netratate, în Arizona (Bausum şi colab., 1976). Într-o localitate din California, Moore şi colab. (1979) au efectuat în două etape investigaţii pe terenuri irigate prin aspersiune cu ape fecalo-menajere parţial tratate, pe probe recoltate simultan cu mai multe aparate instalate la diferite distanţe pînă la 50 m de la marginea terenului irigat, în aval pe direcţia vîntului dominant. S-a constatat că nivelurile UFP/l ale fagului coli în probele din efluentul secundar al apelor reziduale au fost cu 3—4 $\log_{10}$ unităţi mai mare faţă de nivelurile enterovirusurilor. Fagul coli a fost detectat pe toată distanţa de la marginea terenului pînă la 50 m. Dintre enterovirusuri au fost izolate poliovirusurile tip 1, 2 şi 3, virusurile Coxsackie B3, 4 şi 5 şi virusurile ECHO tipurile 1 şi 21.

Avînd în vedere dificultăţile tehnice în izolarea enterovirusurilor din probele de aer, s-a propus de a se folosi ca indicatori colifagii. Astfel, Brenner şi colab. (1980) au arătat că, deşi nu s-au găsit enterovirusuri în aerosolii deasupra bazinelor de aerare şi a instalaţiilor de irigaţie, totuşi colifagul a fost prezent în limitele de 1—9 m^3 de aer recoltat. Posibilitatea de a utiliza colifagii ca indicator de poluare enterovirală a aerului a fost studiată şi de alţi cercetători (Fannin şi colab., 1977; Moore şi colab., 1979; Teltsch şi colab., 1980).

5.4.3. METODE DE EVIDENŢIERE A ENTEROVIRUSURILOR ÎN AER

Elaborarea metodelor de izolare a enterovirusurilor din aer şi eficienţa lor întîmpină o serie de dificultăţi legate de tehnicile de recoltare şi concentrare. Studiile asupra eficienţei metodelor de detectare din aerosoli constau fie din pulverizarea unor suspensii cunoscute de virus în boxe special amenajate în acest scop şi apoi reizolarea lor din probele recoltate, fie din aplicarea lor în teren.

Pentru recoltarea probelor de aer în vederea examenelor virusologice, au fost încercate şi adaptate metode similare cu cele utilizate pentru examene bacteriologice: sedimentare simplă în vase expuse liber sau pe suprafeţe adezive sau recoltare prin aspirare, aerul fiind trecut prin diferite tipuri de impingere în care ca lichide de captare sînt utilizate apa de

Scanned with OKEN Scanner

robinet, apa distilată sterilă, mediu 199 (Parker, Morton, Morgan), bulion infuzie de creier şi cord cu adaos de 0,1 % Tween 80 etc. Pentru concentrarea virusurilor din lichidul de captare au fost propuse DEAE-celuloză sau sisteme polimerice lichide bifazice. Alţi autori au propus pentru detectarea virusurilor din aer metode bazate pe principiul precipitării electrostatice (Petrilli, 1977; Moore şi colab., 1979).

Detalii asupra metodelor menţionate şi a aparaturii utilizate pentru detectarea virusurilor în aer pot fi obţinute din literatura de specialitate consacrată acestui subiect (Sinroku, 1978; Brenner şi colab., 1980). Majoritatea autorilor menţionează că eficienţa metodelor de detectare a virusurilor din aer depinde de volumul de aer recoltat, funcţionarea optimă a dispozitivelor folosite şi proprietăţile lichidului de captare.

În continuare, prezentăm cîteva metode de elecţie pentru detectarea enterovirusurilor în aerul din încăperile spitaliceşti sau colectivităţi de copii sau aerul comunal în vederea controlului virusologic al aerului.

În ţara noastră, Brănescu (1975), în vederea verificării metodei propuse, a contaminat aerul unei boxe cu virus Coxsackie A4. Recoltarea aerosolilor virali din această cameră s-a făcut cu un macroimpinger avînd ca lichid de captare apă bidistilată sterilă (25 cm^3); impingerul s-a racordat la un aspirator electric de tip Krotov care înregistrează volumul aerului aspirat. Pentru debarasarea aerului aspirat de flora microbiană banală, s-a adaptat la macroimpinger un filtru Schott G5 iar lichidul de captare era tratat cu antibiotice. Inocularea acestuia la şoarecele nou-născut a permis reizolarea virusului. Metoda, relativ simplă, poate fi utilizată în special în controlul infecţiilor intraspitaliceşti de etiologie enterovirală.

Pentru izolarea virusurilor din aerul încăperilor, Dmitreva (1977) şi Dmitreva şi Doskina (1980) au studiat experimental şi în teren următoarea metodă pe care o consideră de elecţie: recoltarea probelor de aer cu ajutorul aparatului POV—1 sau PAN—1 în volum de 500—1 000 de litri concomitent din 3 puncte ale încăperii; lichidul de captare a aerului conţine 7 ml mediu 199, 3 ml poliglicină (sol. 6 % de dextran sulfat) şi antibiotice; după recoltare, la lichidul de captare se adaugă PEG 30 % pînă la apariţia turbidităţii şi ClNa 5M; suspensia se agită, se centrifughează sau se lasă la frigider timp de 24 de ore la 4°C pentru separarea polimerilor, virusurile concentrîndu-se în stratul inferior sau în zona de delimitare.

O altă metodă pentru controlul virusologic al aerului din jurul terenurilor irigate cu ape uzate a fost propusă de Moore şi colab. (1979). Autorii au folosit pentru recoltarea probelor de aer poluat aparate aspiratoare de tip Litton care asigură trecerea unui volum mare de aer (400—1 200 l/min) şi reţinerea aerosolilor pe principiul precipitării electrostatice, funcţionînd la o tensiune de 15 000 de volţi. Ca lichid de captare a aerosolilor din interiorul aparatului a fost utilizat bulionul infuzie de creier şi cord (BHI Lab. Difco) cu adaos de 0,1 % Tween 80. Concentrarea virusurilor din acest lichid s-a făcut cu un sistem polimer apos de două faze conţinînd sodiu dextran sulfat şi PEG (0,2 % Na DS, 6,5, PEG 6000 şi 0,15 M NaCl). Probele concentrate au fost diluate cu soluţie Hanks sterilă 1 : 3, tratate cu antibiotice şi inoculate pe gazde de laborator.

În concluzie, detectarea enterovirusurilor în aerul încăperilor sau în aerul comunal nu constituie, încă, o metodă de uz curent. Se impune îmbunătăţirea procedeelor de recoltare şi de concentrare a virusurilor

Scanned with OKEN Scanner

din aerosolii aflaţi în aer în concentraţii extrem de reduse. Procedeele relatate pot constitui o bază pentru viitoare evaluări asupra importanţei pentru sănătatea publică a prezenţei virusurilor enterice în încăperi şi în aerul din zonele cu risc crescut menţionate.

5.4.4. INACTIVAREA ENTEROVIRUSURILOR ÎN AER ŞI MĂSURI DE PROTECŢIE

Observaţii de teren şi cercetări experimentale au evidenţiat influenţa unor factori ai mediului extern asupra duratei de supravieţuire şi a inactivării virusurilor din aer: temperatură, radiaţii solare şi ultraviolete, prezenţă de substanţe organice şi, în special, gradul de umiditate (Fannin şi colab., 1976; Teltsch şi Katzenelson, 1978), rezultatele obţinute stînd la baza măsurilor de control virusologic sanitar al aerului.

La o temperatură medie de 20—22°C a mediului ambiant, enterovirusurile, spre deosebire de alte virusuri, rămîn rezistente un timp relativ îndelungat de săptămîni şi chiar de luni de zile. Temperatura scăzută favorizează supravieţuirea enterovirusurilor iar căldura duce treptat la inactivarea lor. Îngheţul şi dezgheţul repetat influenţează negativ durata de supravieţuire a acestora.

Radiaţiile solare, ultravioletele şi prezenţa ozonului din aer acţionează ca factori inactivanţi asupra virusurilor din aerosoli. Gradul de ionizare a aerului, polaritatea predominantă a ionilor în atmosferă pot contribui la aglomerarea sau dispersarea aerosolilor virali printr-un efect electrostatic de atracţie sau respingere a acestora.

Un alt factor important ce influenţează viteza de inactivare a enterovirusurilor este reprezentat de gradul de incorporare a acestora în materiile organice din exsudatul nazofaringian şi din fecale. Materiile organice formează un înveliş protector faţă de factorii inactivanţi din mediul ambiant.

În sfîrşit, gradul de umiditate a aerului a fost mai larg studiat, evidenţiindu-se ca unul dintre factorii cei mai importanţi care influenţează inactivarea enterovirusurilor. De exemplu, Dmitreva (1973) a efectuat un experiment folosind o boxă cu capacitatea de 500 l, în care cu ajutorul unui pulverizator de sticlă a dispersat timp de 2 minute suspensii de virus printre care şi virusul ECHO tip 7. Probele de aer din boxă, cîte 20 de litri fiecare, se recoltau cu aparatul aspirator Recimenskii, la intervale de 5 şi 30 de minute, 1, 3, 5, 7 şi 24 de ore după dispersarea suspensiei. Din tabelul 5.16 reiese că virusul ECHO tip 7 cuprins în aerosoli s-a inac-

Tabelul 5.16

Dinamica inactivării virusului ECHO tip 7 în aerosoli în diferite condiţii de umiditate relativă (Dmitreva 1973)

Umiditatea relativă iniţială %	Titrul iniţial	Titrul după:							
		minute		ore					
		5	30	1	2	3	5	7	24
20—25	7,0	4,75	0,90	0,90	—	0	0	0	0
50—55	7,0	2,05	2,05	1,35	—	0,35	0,30	0,15	0
80—85	7,0	3,75	2,55	1,95	—	0,96	0,60	0,50	0,15

Observaţii: Titrul viral este exprimat în valori log. negative de DCP/50/0,2 ml şi reprezintă media geometrică din 5—7 serii de probe pentru fiecare variantă experimentată a umidităţii relative a aerului.

Scanned with OKEN Scanner

tivat în 1 oră la o umiditate relativă scăzută (20—25%), în timp ce la o umiditate crescută (80—85%) a persistat peste timpul de urmărire în experiment (24 ore).

Mecanismul de inactivare a virusurilor la umiditate scăzută nu este încă pe deplin elucidat. Datele din literatura de specialitate corelează acest fenomen cu modificările structurale ale particulelor virale, care constau dintr-o deshidratare rapidă a acizilor nucleici din corpul viral ceea ce duce la inactivarea virusurilor aflate în aerosoli. Acest mecanism s-a confirmat pentru poliovirus dar nu poate explica inactivarea rapidă a altor grupuri de virusuri (mixovirusuri ş.a.) la o umiditate relativă ridicată de această dată. S-a ajuns astfel la ipoteza rolului învelişurilor protectoare suplimentare care înfăşoară nucleoproteinele corpului viral şi care protejează împotriva efectului nociv al deshidratării bruşte în cazul umidităţii relative reduse. Dimpotrivă, în cazul enterovirusurilor lipsite de asemenea înveliş protector, umiditatea relativă redusă duce la inactivarea lor rapidă. În sprijinul acestei ipoteze pledează experimentările care au arătat că prin înlăturarea proteinelor şi a sărurilor din învelişurile unor virusuri rezistenţa acestora faţă de umiditatea redusă nu este influenţată, dar este grăbită inactivarea lor la o umiditate relativă ridicată. Carbohidraţii, şi în special inozita, au favorizat rezistenţa virusului la umiditatea scăzută şi nu au influenţat efectul inactivant al umidităţii crescute.

În sfîrşit, trebuie de remarcat că în natură acţiunea factorilor menţionaţi este complexă şi concomitentă, variabilă ca intensitate şi durată, ceea ce face dificilă aprecierea aportului fiecărui factor separat.

În ceea ce priveşte măsurile de protecţie şi de control sanitar au fost propuse:

— pentru încăperi, procedee de decontaminare a aerosolilor prin ultraviolete, filtrare sau prin intermediul unor aparate care funcţionează pe principiul de ardere şi care pot fi instalate în orice încăpere unde există aer condiţionat (Cooper, 1974);

— pentru uzinele de tratare a apelor uzate s-a preconizat acoperirea bazinelor de aeraţie cu folii subţiri de material plastic pentru a se reduce dispersia aerosolilor în mediul ambiant;

— pentru zonele în care se practică irigarea terenurilor agricole s-a propus amenajarea unui perimetru de protecţie de 800 m de la locul de aspersiune, plantarea de perdele de vegetaţie care să oprească dispersarea virusurilor şi stabilirea metodelor minime de tratare a apelor uzate ce urmează a fi pulverizate (dezinfecţie);

— pentru staţiunile balneare şi turistice maritime se impune o atenţie deosebită în cadrul controlului sanitar preventiv al aerului; deoarece formarea de aerosoli este inevitabilă, se impune ca apele uzate care se devarsă în apropierea centrelor populate să fie tratate corespunzător.

În concluzie, pentru investigarea prezenţei enterovirusurilor în aerul ambiant nu există încă metode curente accesibile unităţilor sanitaro-antiepidemice din teren, ceea ce justifică intensificarea cercetărilor pentru elaborarea metodelor adecvate de izolare şi identificare a enterovirusurilor din aer. Aceste investigaţii vor permite evaluarea riscului de transmitere a infecţiilor enterovirale pe cale aeriană, în special a riscului profesional din uzinele de tratare a apelor uzate şi în zonele agricole irigate.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

BAUSUM H. T., SCHAUB S. A., SORBER C. A. (1976), *Viral and bacterial aerosols at a wastewater spray irrigation site*, Abst. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Atlantic City, Washington, D. C., p. 193.

BAYLOR E. R., PETERS V., BAYLOR M. B. (1977a), *Water-to-air transfer of virus*, Science, **197**, 763–764.

BAYLOR E. R., BAYLOR M. B., BLANCHARD D. C., SYZDEK L. D., APPEL C. (1977b), *Virus transfer from surface to wind*, Science, **198**, 575–580.

BLANCHARD D. C., SYZDEK L. D. (1974), *Importance of bubble scavenging in the water-to-air transfer of organic material and bacteria*, J. Rech. atm., *8*, 529–540.

BRĂNESCU L. (1975 , *Contribuţii la metodologia izolării unor virusuri din aer*, Igiena, **24**, *3*, 183–186.

BRENNER K. P., SCARPIN P. V., CLARK C. S. (1980), *Viruses in aerosols at a wastewater sprinkler irrigation site* Abstr. of the 79th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., p. 210.

COOPER R. E. (1974), *Exhaust gas treatment system*, Liberty Ind. Inc. Pat. S.U.A., p. 432–522.

COUCH R. B., DOUGLAS R. G., LINDGREN K. M., GERONE P. J., KNIGHT V. (1970), *Airborne transmission of respiratory infection with Coxsackie virus A type 21*, Amer. J. Epidemiol., **91**, *1*, 78–86.

DMITREVA R. A. (1973), *K voprosu ob inactivaţii virusov v vozduhe*, J. Microbiol., *4*, 21–24.

DMITREVA R. A. (1977), *Usoverşenstovanie metodov virusologhicescovo isledovanie vozduha zacritih pomescenii*. In : *Ghighieniceschie aspecti ohranîocrujaiuşcei sredi*, Moscova, *5*, p. 99–101.

DMITRIEVA R. A., DOSKINA T. V. (1980), *Metodi vîdelenia chişecinih i respiratornih virusov iz razlicinih obiectov okrujaiuşcei sredi*, Ghigh. Sanit., *5*, 40–41.

FANNIN K. F., SPENDLOVE J. C., COCHRAN K. W., GANNON J. J. (1976), *Airborne coliphage from wastewater treatment facilities*, Appl. environ. Microbiol., **31**, 705–710.

FANNIN K. F., SPENDLOVE J. C., COCHRAN K. W., GANNON J. J. (1977), *Field studies on coliphages and coliforms as indicators of airborne animal viral contamination from wastewater treatment facilities*, Water Res., **11**, 181–188.

FEACHEM R., GARELICK H., SLADE J. (1981), *Enteroviruses in the environment*, Trop. Dis. Bull., **78**, *3*, 203–204.

GERBA C. P., WALLIS C., MELNICK J. L. (1975), *Microbiological hazards of house toilets. Droplet production and the fate of residual organisms*, Appl. Microbiol., **30**, 229–237.

KARPUHIN G. I., SLOBODENIUK V. K., SLOBODENIUK A. V. (1968), *Experimentalnîie osnovi metoda dezinfecţii s aersoli pri virusnih infecţiah. Ie Soobscenie. Metodologhia calicestvenovo opredelenia virusov na zagreaznenih poverhnostiah cerez aerosolizaţii*, J. Microbiol., **45**, *10*, 135–138.

KATZENELSON E., BUIUM I., SHUVAL H. I. (1976), *Risk of communicable disease infection associated with wastewater irrigation in agricultural settlements*, Science, **194**, 944–946.

MC GARRITY G. J., CORIELL L. L. (1973), *Mass airlow cabinet for control of airborne infection of laboratory rodents*, Appl. Microbiol., **26**, *2*, 167–172.

MELNICK J. L., GERBA P. C., WALLIS C. (1978), *Viruses in water*, Bull. W.H.O., **56**, *4*, 499–508.

MOORE B. E., SAGIK B. P., SORBER C. A. (1979), *Procedure for the recovery of airborne human enteric viruses during spray irrigation of treated wastewater*, Appl. environ. Microbiol., **38**, *4*, 688–693.

PARKER D. T. (1977), *Microbial aerosols from food processing waste spray fields*, J. Water Pollut, Contr. Fed., **49**, 2359–2365.

PETRILLI F. L. (1977), *Introduction to the study of viral contamination of seawater*, Rev. int. Oceanogr. Med., **48**, *2*, 5–7.

SINROKU O. (1978), *Ecology of enterovirus in the tropics : mode of transmission in urban and rural communities*, Abst. IV Intern. Congr. Virol., Hague, August 30 – September 6, 153.

SLOTE L. (1976), *Viral aerosols. A potential occupationally related health threat in aerated wastewater treatment systems*, J. environ. Health., **38**, *5*, 310–314.

SORBER C. A., SCHAUB S. A., BAUSUM H. T. (1974), *An assessment of a potential virus hazard associated with spray irrigation of domestic wastewater*. In : *Virus survival water and wastewater system*, Austin, p. 241–252.

Scanned with OKEN Scanner

STEIRMANN J. (1979), *Viren in der Unwelt des Menschen*, Forum-Städte Hyg., **30**, *9—10*, 214—216.
TELTSCH B., KATZENELSON E. (1978), *Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater*, Appl. environ. Microbiol., **35**, *2*, 290—296.
TELTSCH B., KEDMI S., BONNET L., BORENZSTAYN-ROTEM Y., KATZENELSON E. (1980), *Isolation and identification of pathogenic microorganism as wastewater irrigated filds ratios in air wastewater*, Appl. environ. Microbiol., **39**, *6*, 1183—1190.
TEODOROVICI GR. (1978), *Epidemiologia bolilor transmisibile*, Ed. medicală, București, p. 148—158.
* * * (1979), *Les virus humains dans l'eau, les eaux usées et le sol*, Série Rapp. Techn. O.M.S., nº 639, p. 24—26.

5.5. ENTEROVIRUSURILE NEPOLIOMIELITICE PE DIFERITE SUPRAFEȚE

5.1.1. PREZENȚA ENTEROVIRUSURILOR PE SUPRAFEȚE ȘI METODELE DE EVIDENȚIERE A ACESTORA

Prezența în masa populației a eliminatorilor de enterovirusuri are drept consecință o largă răspîndire a acestora pe diferite suprafețe și obiecte, în special în condițiile de strînsă coabitare din colectivități infantile sau din familii.

În ultimul deceniu au apărut în literatura de specialitate unele lucrări care au evidențiat prezența enterovirusurilor pe diferite obiecte din colectivitățile de copii (Bondarenko și colab., 1971; Grigorieva și Bondarenko, 1970) sau din unitățile de alimentație publică (Candeias și colab., 1968), dar cercetările în acest domeniu sînt limitate la număr datorită dificultăților de evidențiere a enterovirusurilor în mediul ambiant. Pentru aprecierea potențialului epidemiologic al acestora, atenția cercetătorilor s-a orientat și spre studii experimentale privind durata de supraviețuire a enterovirusurilor pe obiecte și suprafețe în diferite condiții de temperatură, umiditate și luminozitate și asupra posibilităților de întrerupere a acestui mod de transmitere a infecției.

Evidențierea enterovirusurilor pe suprafețele obiectelor, efectelor, încăperilor a fost realizată în special în cadrul colectivităților de copii, internatelor, cantinelor sau a unităților de alimentație publică. Cercetările se referă la veselă, lenjerie de corp, de pat, îmbrăcăminte, pereții și dușumelele încăperilor, mînerele ușilor precum și unele utilaje specifice unităților de alimentație publică. Metodele de evidențiere a enterovirusurilor de pe suprafața obiectelor cercetate, cu toate variantele de detaliu adoptate de diferiți autori, se bazează pe recoltarea probelor, eliminarea florei microbiene și a substanțelor organice și anorganice, concentrarea virusurilor în suspensie (în unele situații), inocularea pe culturi celulare sau pe șoarecele nou-născut și identificarea serotipurilor pentru tulpinile izolate.

Recoltarea probelor de pe suprafețele dure și netede se realizează cu tampoane de vată sterilă umectate cu apă de robinet sterilizată sau cu soluție Hanks, locurile alese pentru recoltare fiind dimensionate la o suprafață de 100 cm². Pentru obiecte mărunte (veselă, jucării etc.) se practică recoltări pe cîte 3 obiecte de aceeași categorie, din care, prin amestec, rezultă un eșantion mediu. Probele recoltate cu tamponul se descarcă în 4 ml soluție Hanks și se tratează cu antibiotice. Ele pot fi concentrate în prealabil pe rășini sintetice urmînd apoi inocularea pe culturi celulare sau pe șoarece nou-născut.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.17

Prezenţa enterovirusurilor nepoliomielitice pe diferite obiecte din instituţii de copii (Bondarenko şi colab., 1971)

Instituţia cercetată	Obiecte de uz curent			Tipurile antigenice = număr tulpini izolate
	Nr. de probe		Nr. tulpini izolate	
	Total	Pozitive		
Spital de copii	44	7	7	E7=2 ; E2=1 ; B4=1 ; B5=2 ; A4=1
Creşa a	84	11	11	E19=1 ; B3=4 ; B5=3 ; B6=2 ; A9=1 ; N=2
Creşa b	74	6	6	E1=1 ; E7=1 ; E19=1 ; B1=1 ; A9=2
Creşa c	74	5	6	B1=2 ; A9=2 ; PI=1 ; PIII=1
TOTAL	276	29	30	10,9 %

E=ECHO ; A şi B = virus Coxsackie A şi B ; P = poliovirus ; N = netipizabil

Printre primele investigaţii privind răspîndirea enterovirusurilor pe obiecte şi suprafeţe în colectivităţi de copii sînt cele efectuate de Grigorieva şi Bondarenko (1970) şi Bondarenko şi colab. (1971) care au cercetat prezenţa enterovirusurilor pe farfurii, ceşti, linguri, jucării, scutece, prosoape, lenjerie de corp şi de pat, masa de înfăşat, ţarc, pat, duşumele, pervazuri, mînerele uşilor, mîinile copiilor şi ale personalului, precum şi pe instrumentar medical (termometre, spatule, pense etc). În tabelul 5.17 sînt redate rezultatele investigaţiilor efectuate în patru instituţii de copii, 10,9 % din totalul probelor prelevate de pe suprafaţa obiectelor cercetate fiind pozitive pentru enterovirusuri nepoliomielitice. Mai frecvent contaminate au fost scutecele, mesele de înfăşat, duşumelele şi suprafeţele ţarcului. Sub aspect sezonier, autorii semnalează izolări mai frecvente în lunile de vară şi toamnă.

Dintre investigaţiile efectuate în unităţi cu profil alimentar, menţionăm pe cele ale lui Candeias şi colab. (1968) care au evidenţiat enterovirusuri de pe paharele dintr-o serie de cafenele şi baruri din oraşul São Paulo înregistrînd predominanţa virusului ECHO tip 11.

În ţara noastră, în perioada 1978—1982, în laboratorul de virusologie al Institutului de igienă şi sănătate publică Iaşi, au fost efectuate investigaţii pe un număr total de 2 543 de probe de pe suprafeţe din colectivităţi de copii, cabinete medicale şi unităţi alimentare (Zavate şi colab., 1980 a, b ; Cotor şi colab., 1981 ; Avram şi colab., 1982, 1983 ; Zavate, 1983). Incidenţa izolărilor pentru diferite categorii de unităţi în care s-au efectuat cercetările este redată în figura 5.11. În medie, enterovirusurile au fost izolate în 9,7 % din cele 631 probe recoltate în colectivităţi de copii (leagăn, grădiniţă), în 1,8 % din 1 336 de probe recoltate în cabinete medicale (de pediatrie, stomatologie, şcolare etc.) şi în 1,7 % din 576 de probe recoltate în unităţi de alimentaţie publică (alimentară cu autoservire, bufet expres, cofetărie, aprozar). Obiectele de pe care au fost izolate enterovirusurile în colectivităţi de copii sînt redate în tabelul 5.18. În ordinea frecvenţei, enterovirusurile au fost izolate de pe termometre, căniţe, duşumea, jucării etc. În cabinetele medicale şi unităţile alimentare enterovirusurile au fost izolate cel mai frecvent pe duşumea, clanţe, mese etc.

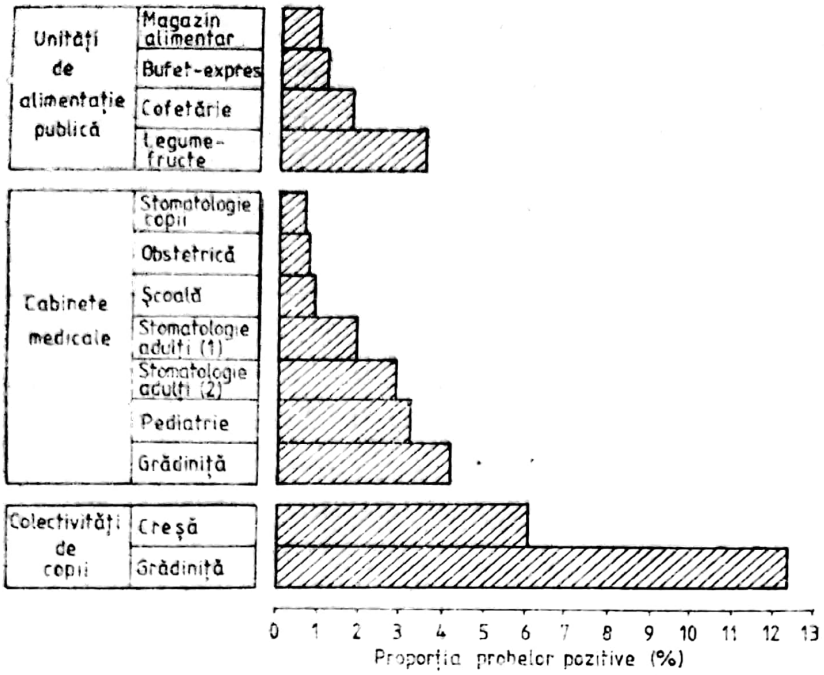


Fig. 5.11. — Incidenţa izolărilor de enterovirusuri de pe suprafeţe în diferite unităţi publice.

Tabelul 5.18

Prezenţa enterovirusurilor pe diferite suprafeţe în colectivităţi de copii

Suprafaţa	Caracteristici	Creşă			Grădiniţă			TOTAL		
		Nr. probe	Izolări		Nr. probe	Izolări		Nr. probe	Izolări	
			nr.	%*		nr.	%*		nr.	%*
Mîini	copii,	45	2	4,4	41	5	12,2	86	7	8,1
	adulţi	37	0	0	26	3	11,5	63	3	4,8
Veselă	farfurii,	11	2	18,1	20	1	5,0	31	3	9,7
	căniţe,	14	2	14,2	20	4	20,0	34	6	17,6
	linguriţe	10	0	0	—	—	—	10	0	0
Jucării	plastic,	10	0	0	18	3	16,7	28	3	10,7
	cauciuc,	13	0	0	11	0	0	24	0	0
	pînză, lemn, metal	3	0	0	11	0	0	14	0	0
Pătuţ	tăblie lemn	48	3	6,3	28	7	25,0	76	10	13,2
Masă	plastic,	18	0	0	39	3	7,7	57	3	5,3
	tablă, sticlă,	3	0	0	5	0	0	8	0	0
	lemn	4	0	0	18	2	11,1	22	2	9,1
Duşumea	parchet,	22	0	0	13	3	23,1	35	3	8,6
	mozaic	2	0	0	17	3	17,6	19	3	15,9
Prosop	bumbac	5	0	0	18[a]	2	11,1	23	2	8,7
					19[b]	0	0	19	0	0
Termometru	înainte de utilizare ;	5	4	80,0	12	2	16,7	17	6	35,3
	după utilizare	5	3	60,0	—	—	—	5	3	40,0
Pelinci şi cearşaf	utilizate ;	3	0	0	30	7	23,0	33	7	21,2
	neutilizate	3	0	0	21	1	4,8	24	1	4,7
TOTAL		261	16	6,1	367	46	12,5	628	62	9,0

* Proporţii orientative [a] utilizat ; [b] neutilizat

Scanned with OKEN Scanner

Virusurile Coxsackie grup A au reprezentat 48,2 % din totalul tulpinilor identificate, virusurile Coxsackie grup B 30,6 %, ECHO 14,1 %, iar poliovirusurile 7,1 %.

5.5.2. STUDII PRIVIND DURATA DE SUPRAVIEȚUIRE A ENTEROVIRUSURILOR PE SUPRAFEȚE ȘI PE DIFERITE OBIECTE ȘI POSIBILITĂȚI DE INACTIVARE

Studiile experimentale privind durata de supraviețuire a enterovirusurilor pe diferite suprafețe au constituit un obiectiv important pentru cunoașterea riscului de contaminare a mediului înconjurător. În tabelul 5.19 este

Tabelul 5.19

Durata de supraviețuire a unor enterovirusuri pe suprafața diferitelor materiale în condiții experimentale

Materialul	Autori și an	Virus	Durata de supraviețuire
Țesături de bumbac	Dixon și colab., 1966 Kiseleva, 1965 Mazur și Orlowska, 1974 Cotor și colab., 1980	Polio Polio Polio Polio	1—4 săpt. 24 ore 4 săpt. 3 zile
Țesături de in	Mazur și Orlowska, 1974	Polio	1—2 săpt.
Țesături de lînă	Dixon și colab., 1966 Mazur și Orlowska, 1974	Polio Polio	20 săpt. 5 săpt.
Țesături fibre sintetice	Mazur și Orlowska, 1974	Polio	1—2 săpt.
Hîrtie	Kiseleva, 1965	Polio	24 ore
Lemn	Kiseleva, 1965 Cotor și colab., 1980	Polio Polio	11 zile 14 zile
Sticlă	Kiseleva, 1965 Mahl și Sadler, 1975 Mahl și Sadler, 1975 Cotor i colab., 1980	Polio Polio Coxsackie B3 Polio	11 zile >8 săpt. >2 săpt. 7 zile
Faianță	Cotor și colab., 1980	Polio	5 zile
Email	Cotor și colab., 1980	Polio	5 zile
Ceramică	Mahl și Sadler, 1975	Polio	>8 săpt.
Cauciuc	Cotor și colab., 1980	Polio	3 zile
Mușama	Cotor și colab., 1980	Polio	9 zile
Plastic	Cotor și colab., 1980	Polio	9 zile
Oțel inoxidabil	Mahl și Sadler, 1975	Coxsackie B3	>2 săpt.

prezentată durata de supraviețuire a enterovirusurilor pe diferite suprafețe în condiții experimentale. S-a demonstrat persistența îndelungată a enterovirusurilor pe diferite obiecte și suprafețe ceea ce ridică o serie

Scanned with OKEN Scanner

de probleme de profilaxie speciale în cadrul unor condiţii epidemiologice favorabile apariţiei epidemiilor.

Menţionăm că o serie de factori de mediu, cum ar fi materialul suprafeţei, temperatura, umiditatea etc., influenţează simţitor durata de supravieţuire a enterovirusurilor. Astfel, Kiseleva (1965) remarca încă de la primele cercetări că durata de supravieţuire a enterovirusurilor (reprezentate de poliovirus) pe suprafaţa obiectelor a fost de 24 de ore pe ţesăturile de bumbac şi de celuloză şi de 11 zile pe suprafeţe de sticlă şi de lemn vopsit. Durata de supravieţuire depinde, de asemenea, de temperatura ambiantă. La temperatura de 37°C enterovirusurile supravieţuiau cîteva ore (maximum 2 zile), iar la 4°C între 7 şi 11 zile.

Buckland şi Tyrrell (1962), cercetînd relaţia dintre gradul de umiditate relativă a aerului şi durata de supravieţuire a virusurilor, au depus pe lame de sticlă o suspensie de virus sub formă de picături, lame care au fost introduse în patru exsicatoare cu diferite grade de umiditate. După o expunere de 2 $^1/_2$ ore la temperatura camerei, s-a urmărit scăderea titrului în raport cu gradul de umiditate. S-a constatat că procesul de inactivare a fost mai lent în cazul umidităţii relative ridicate a aerului, în timp ce aerul uscat a accelerat acest proces.

Ulterior, Mahl şi Sadler (1975) au urmărit la rîndul lor supravieţuirea virusurilor pe lame de sticlă în diferite condiţii de temperatură şi umiditate relativă. Autorii au constatat că virusul polio 2 a supravieţuit cel puţin 8 săptămîni în condiţii de umiditate relativă scăzută, iar virusul Coxsackie B3 a supravieţuit un timp mai scurt, de numai 2 săptămîni, fără să se observe influenţa umidităţii sau temperaturii aerului în experimentare. Mc Geady şi colab. (1979) au arătat experimental, la rîndul lor, că virusul Coxsackie B3 a fost stabil la 6°C şi pH 7. La desecare titrul a scăzut cu 0,2 log la 23°C şi cu 3 log la 37°C. În privinţa ţesăturilor de bumbac, lînă şi fibre sintetice Sidwell şi colab. (1970) au ajuns la concluzia că titrul virusului polio (luat ca indicator), pulverizat sau picurat pe confecţiile de bumbac, descreşte exponenţial pînă la niveluri nedetectabile, în timp ce pe confecţiile de lînă descreşte spre niveluri coborîte dar totuşi detectabile un timp mai îndelungat. La o umiditate relativă crescută (78 %) perioada de persistenţă se scurtează.

Un experiment demonstrativ privind durata de supravieţuire a enterovirusurilor (poliovirus luat ca indicator) pe suprafeţe inerte confecţionate din diferite materiale a fost realizat în laboratorul de virusologie al Institutului de igienă şi sănătate publică din Iaşi (Cotor şi colab., 1980). În vederea efectuării experimentului, au fost fixate pe un suport comun opt pătrate cu o suprafaţă de 100 cm² confecţionate din următoarele materiale: muşama, plastic, lemn, cauciuc, pînză de bumbac, sticlă, email şi faianţă. Suspensia virală avînd un titru de $10^{-9,5}$ DL_{50} în cantitate de cîte 1 ml a fost etalată (frotiu) pe suprafeţele respective cu ajutorul unei lame pentru a se asigura o răspîndire cît mai uniformă. În cazul pînzei, s-a folosit 1 ml de suspensie virală în 3 ml soluţie Hanks, cei 4 ml rezultaţi fiind necesari pentru îmbibarea ei uniformă. Toate suprafeţele expuse pe suport au fost menţinute la luminozitatea şi temperatura camerei (23—25°C) la o umiditate de 41—47 %. Recoltările pentru urmărirea duratei de supravieţuire a poliovirusului au fost făcute la intervale de 1, 6 şi 24 ore apoi la 3, 5, 7, 9, 14, 21 şi 28 de zile.

Durata minimă de supravieţuire s-a înregistrat pe suprafeţele de cauciuc şi pînză (3 zile), urmată de suprafeţele de email şi faianţă (5 zile), de sticlă (7 zile), de muşama şi plastic (9 zile), durata maximă de supra-

Scanned with OKEN Scanner

viețuire înregistrîndu-se pe suprafața de lemn (14 zile). La 21 de zile poliovirusul nu a mai putut fi pus în evidență pe nici una dintre suprafețe.

Pe lîngă investigarea rolului temperaturii și umidității ambiante s-a mai studiat și rolul luminozității (Mahl și Sadler, 1975), demonstrîndu-se că la întuneric virusurile se distrugeau mai lent decît la lumina zilei.

O altă serie de investigații au urmărit transmiterea enterovirusurilor prin contact direct de la fragmentele de țesătură de bumbac, lînă și fibre sintetice contaminate, la altele sterile. Prin amestecarea lor s-a constatat că transferul maxim al virusului polio a fost realizat cu materialele de lînă.

În ceea ce privește măsurile de îndepărtare, Sidwell și colab. (1971) au urmărit eficiența spălării țesăturilor de bumbac (cămăși, cearșafuri), de lînă (pături, pulovere) și de nailon. Contaminarea experimentală cu poliovirus s-a făcut prin pulverizare sau prin picurarea cu pipeta. Spălarea s-a făcut cu detergenți anionici și nonanionici, în apă caldă și rece. S-a constatat că, indiferent de tipul de detergent, titrul poliovirusului a scăzut considerabil după procesul de spălare și a continuat să scadă după uscare timp de 20 de ore. Categoria efectelor nu a constituit un factor decisiv, totuși virusul s-a eliminat mult mai repede de pe confecțiile de nailon și a persistat mai îndelungat la spălarea cu detergenți anionici în apă caldă în țesătura de lînă.

Dintre metodele moderne de dezinfecție utilizate pentru inactivarea enterovirusurilor de pe suprafețe cităm investigațiile lui Jordy și colab. (1975) care au studiat acțiunea inactivantă a oxidului de etilen 45—90%. Inactivarea cea mai eficientă a virusurilor Coxsackie B s-a obținut la acțiunea amestecului de oxid de etilen cu metilformiat și CO_2. Virusurile ECHO se inactivau mai ușor decît virusurile Coxsackie. Alte lucrări asupra dezinfecției corecte a suprafețelelor contaminate cu enterovirusuri, metodelor de măsurare a activității virulicide a antisepticelor în faza apoasă și mecanismului de acțiune a acestora au fost publicate de Gaustad și colab. (1974), Drulak și colab. (1978 a,b), Gevaudan și colab. (1980), Ivan și colab. (1981) și de alți autori citați în capitolul 1.1 consacrat acțiunii agenților chimici asupra enterovirusurilor.

În încheiere, se poate afirma că prezența enterovirusurilor pe suprafețele din mediul înconjurător, în colectivități cu risc crescut, reflectă potențialul epidemiologic al acestora, datele obținute, la care se adaugă rezultatele cercetărilor experimentale privind durata de supraviețuire a enterovirusurilor în mediul ambiant, impunînd luarea unor măsuri corecte de dezinfecție și sterilizare.

BIBLIOGRAFIE

AVRAM G., VASILESCU G., RUSU M., BÂRLEANU L., VATAMANU R., BURLEA T. UNGUREANU M., MAXIM V. (1982), *Cercetări asupra poluării virale și microbiene a unor suprafețe din cabinetele medicale*, Vol. Rez. Ses. St. IISP Iași, 6—7 mai, 11.

AVRAM G., VASILESCU G., COTOR F., ZAVATE O. (1983), *Investigații privind gradul de poluare virală și microbiană a suprafețelor din unități alimentare*. În : Vol. Rez. Ses. Șt., I.I.S.P. Iași, 11—12 febr.

BONDARENKO V. I., GRIGORIEVA L. V., ERUSALEMSKAIA L. F. (1971), *Nahodenie enterovirusov v isprajneniah detei i na predmetah obihoda v detskih ucerejdeniah*. J. Microbiol. Epidemiol. Immunol., *8*, 130—138.

BUCKLAND F. E., TYRRELL D. A.I. (1962), *Loss of infectivity on drying various viruses*, Nature (London), **195**, 1063—1064.

Scanned with OKEN Scanner

CANDEIAS J., ALMEIDA C. D., COTTILLO Z.L.G. (1968), *Isolation of virus from drinking glasses in coffee shops and bars in the city São Paulo.* Rev. Sande publ., **2**, *2*, 174—179.

COTOR F., TIRON S., ZAVATE O. (1980), *Durata de supraviețuire a poliovirusurilor pe suprafețe inerte.* In : Vol. Ses. Șt. anuală a I.I.S.P. Iași, 12—13 febr., p. 51.

COTOR F., AVRAM G., GOȚEA S., IVAN A., ZAVATE O. (1981), *Enterovirusurile circulante în masa populației infantile și în mediul ambiant în anul 1980 în zona Iași.* In : Vol. Ses. Șt. anuală a I.I.S.P. Iași, 5 iunie, p. 268.

DIXON G. J., SIDWELL R. W., Mc NELL F. (1966), *Quantitative studies on fabrics as disseminators of viruses II. Persistence of poliomyelitis virus on cotton and woll fabrics.* Appl. Microbiol., **14**, *2*, 183—188.

DRULAK M., WALLBANK A. M., LEBTAG I. (1978a), *The relative effectiveness of commonly used disinfectants in inactivation of echovirus 11.* J. Hyg. (Camb.), *81*, 77—87.

DRULAK M., WALLBANK A. M., LEBTAG I, m WERBOWSKI L., PROFFENROTH L. (1978b), *The relative effectiveness of commonly used disinfectants in inactivation of Coxsackie virus B5.* J. Hyg. (Camb.), *81*, 389—397.

GAUSTAD J. W., MCDUFF C. R., HATCHER H. J. (1974), *Test method for the evaluation of virucidal efficacy of three common liquid surface disinfectants on a simulated environmental surface.* Appl. Microbiol., **28**, *5*, 748—752.

GEVAUDAN M. J., CHARREL J., GEVAUDAN P. (1980), *Note préliminaire sur la mise au point d'une méthode de mesure de l'activité virulicide des antiseptiques en phase aqueuse.* Rev. Inst. Pasteur Lyon, **13**, *3*, 353—357.

GRIGORIEVA L. V., BONDARENKO V. I. (1970), *Sanitaro-virusologhicescoe caracteristiki predmetov obihoda nektorî detschih ucerejdenii.* Ghig. Sanit., *3*, 103—105.

JORDY A., HOFF-JORGENSEN R., FLAGSTAD A., LUND E. (1975), *Virus inactivation by ethylene-oxide-containing gases.* Acta vet. scand., **16**, *3*, 379—387.

KISELEVA L. F. (1965), *Durata păstrării tulpinilor atenuate de virus polio pe diferite obiecte.* In : Vopr. etiopatogheneza i epidemiologhii virusnîh infecții, Sverdlovsk, 111—115.

MAHL M. C., SADLER C. (1975), *Virus survival on inanimate surfaces.* Canad. J. Microbiol., **21**, *6*, 819—823.

MAZUR B. ORLOWSKA M. (1974), *Próba okréslenia czasu zakaznosci tkanin zanieczyszczenych wirusem polio.* Prz. epidemiol., **28**, *4*, 551—558.

McGEADY M. L., SIAK I. S., CROWELL R. I. (1979), *Survival of Coxsackie virus B3 under diverse environmental conditions.* Abst. 79th Ann. Meet. Amer. Microbiology, Los Angeles, Calif., 227.

SIDWELL R. W., DIXON G. J., WESTBROOK L., FORZIATI T. H. (1970), *Quantitative studies on fabrics disseminators of viruses. IV. Virus transmission by dry contact of fabrics.* Appl. Microbiol., **19**, *6*, 850—854.

SIDWELL R. W., DIXON G. I., WESTBROOK I., FORZIATI F. H. (1971), *Quantitative studies on fabrics disseminators of viruses. V. Effect of laundering on poliovirus contaminated fabrics.* Appl. Microbiol., **21**, *2*, 227—234.

ZAVATE O., COTOR F., TIRON S. (1980a), *Prezența și rezistența enterovirusurilor nepoliomielitice pe diferite suprafețe din mediul ambiant.* Igiena, **28**, *4*, 341—344.

ZAVATE O., COTOR F., TIRON S., AVRAM G. (1980b), *Semnificația prezenței enteovirusurilor în mediul ambiant.* Rev. med. — chir. Iași, **84**, *4*, 675, 680.

ZAVATE O., COTOR F., IVAN A., TIRON S., AVRAM G. (1980c), *Investigations on the circulation of enterovirus in a children community.* Rev. roum. Med. Virol., **31**, *4*, 289—293.

ZAVATE O. (1983), *Investigations on the enteroviral pollution of the environment (1978—1982).* Abstr. Vth Congr. Nat. Higiene and Public Health, 22—22 oct. p. 51—52.

Scanned with OKEN Scanner

OLGA ZAVATE and NICOLAE CAJAL

ENTEROVIRUSURI NEPOLIOMIELITICE. Implicații în patologie și în poluarea mediului ambiant *(NON-POLIOMYELITIC ENTEROVIRUSES. Implications in pathology and in environment pollution)*, Editura Academiei, București, 1983, 192 p.

SUMMARY

Discovered about 1950, non-poliomyelitic enteroviruses — Coxsackie and echoviruses — are now incriminated in the etiology of a wide range of clinical manifestations, as well as in environment pollution.

After a short historical review, chapter 1 presents some classification aspects. Enteroviruses are classified in the family *Picornaviridae*, and the characteristics of the genus and of the family are mentioned. Attention is drawn to the necessity of revising the taxonomy of enteroviruses and of establishing some criteria allowing the classification of newly discovered antigenic types.

The properties of non-poliomyelitic enteroviruses are dealt with in chapter 2. Isolation of highly concentrated and purified virus particles and the application of modern investigation techniques (ultracentrifugation, electron microscopy, etc) have made it possible to specify the morphology, structure and size of these viruses. Crystallized forms of Coxsackie and echoviruses are described. The presentation of the chemical structure of these pathogenic agents outlines the fact that each constituent of the virus particle (the nucleic acid and the protein envelope) represents the material support of certain properties. As compared with other viruses, enteroviruses have, in general, a remarkable stability to most of the physical and chemical agents. Mention is made of the sensitivity of enteroviruses to high or low temperature, to electromagnetic and ionizing radiations, to various chemicals and to several antiviral drugs, to interferon, a.o.

Enteroviruses can be cultivated only in cell cultures or laboratory animals. Data are presented on the sensitivity of different cell cultures to enteroviruses and to the aspects of virus multiplication in this substrate: cytopathic effect, formation of plaques under agar, appearance of hemagglutinating properties (in certain strains), pH modifications, presence of virus-specific antigen (visualized by electron microscopy or immunofluorescence), synthesis of specific enzymes, karyotype alterations, etc. Newborn mice and monkeys are the laboratory animals susceptible to enterovirus infection; the clinical and morphopathological features of the experimental disease are described.

Scanned with OKEN Scanner

The process of enterovirus multiplication is described, with its characteristic stages: adsorption, penetration, biosynthesis of viral components, release of virus particles.

The chapter ends with the description of the antigenic properties of enteroviruses, of the antigenic variants mentioned in the literature, of humoral and cell-mediated immunity to enteroviruses and of the interference phenomena observed between non-poliomyelitic enteroviruses and other viruses or between the different antigenic types within the enterovirus group.

Chapter 3 is devoted to the epidemiology, pathogeny and clinical manifestations caused by non-poliomyelitic enteroviruses. These viruses are widespread among the apparently healthy population: the prevalence of carriers may be as high as 80%. Mention is made of the source of infection, of the propagation routes, of the role of socio-economical factors, age, and season, as well as of the antigenic type in the spreading of infection. The steps for the prevention and control of infections induced by non-poliomyelitic enteroviruses and the prospects of specific prophylaxis are presented.

Enteroviruses show a marked clinical polymorphism, as regards both the diversity of syndromes induced and the severity of illness (which may range from inapparent to severe, fatal forms). The most characteristic diseases caused by non-poliomyelitic enteroviruses are neuroinfections, with their three forms of manifestation: aseptic meningitis (which is the most frequent), paralysis and encephalitis. The clinical symptomatology and the antigenic types involved in the etiology of the diseases are described; stress is laid on the contribution of Romanian research workers to the knowledge of these clinical entities. Paralysis induced by non-poliomyelitic enteroviruses (except for Coxsackie A7 and EV71) will result in recovery without any sequelae.

The myotropism of Coxsackie viruses is illustrated in humans by the appearance of the Bornholm disease (epidemic myalgia). The clinical aspect of this entity and the evolution of an outbreak in Moldavia are described.

There has been an increasing amount of literature associating cardiopathies with different antigenic types of Coxsackie viruses, which would cause pericarditis, myocarditis and chronic heart diseases. The possible evolution of an enteroviral myocardiopathy is described and literature data on the causal relationship between enteroviruses and cardiopathy are critically analyzed.

Eruptive diseases — enanthems (herpangina, nodular pharyngitis, stomatitis), exanthems and the hand-foot-and-mouth disease — are caused by Coxsackie A and B, lately also by EV71 viruses. The cases of hand-foot-and-mouth disease recorded in the last 10 years are reviewed and the first case reported in Romania is described.

It appears that non-poliomyelitic enteroviruses can also induce acute respiratory infections, more frequently than usually considered.

Acute hemorrhagic conjunctivitis is the most frequently encountered eye disease caused by non-poliomyelitic enteroviruses; the occurrence of pandemics has been reported, the antigenic types incriminated being EV70 and Coxsackie A24.

The enteroviral etiology of digestive infections is less precise. Diarrheal disease is now mostly ascribed to rotaviruses, and to a much lesser

Scanned with OKEN Scanner

extent to enteroviruses. There have been reports on hepatitis, pancreatitis, juvenile diabetes and kidney diseases associated with certain antigenic types of enteroviruses; it is necessary, however, to extend the observations in this respect.

Finally, prenatal infections, embryopathies, perinatal and neonatal infections ascribed to non-poliomyelitic enteroviruses are described and the nosocomial character of these infections is outlined.

The laboratory diagnosis of infections caused by non-poliomyelitic enteroviruses makes the object of chapter 4. Data are presented with reference to the collection, transport and processing of pathological specimens. The classical methods for etiological diagnosis consist in virological tests (virus isolation and identification) and serological investigations (demonstration of the occurrence or of an at least 4-fold rise in specific antibodies). In addition, several modern methods for rapid diagnosis applicable in the case of enterovirus diseases are described: electron microscopy, immunofluorescence, ELISA, radioimmunoassay, gel-precipitation reactions. The chapter ends with an enumeration of the steps for prevention of laboratory infections.

Chapter 5 is devoted to the problem of non-poliomyelitic enteroviruses in the environment, an aspect that was insufficiently studied in the past, owing to the difficulties implied by virus detection in different elements of the environment. Nowadays the attention of Public Health Departments is focused on this problem, with a view to both human health preservation and the development of adequate steps for environment protection. As illustrated in a scheme, enteroviruses eliminated by the patient or by the healthy carrier may pollute the air, soil, water, food and different objects of the environment; at the same time, there is a risk of their reciprocal contamination.

Water pollution represents the most important and best studied aspect. After a review of the rather few reports in the literature referring to water-borne infections due to non-poliomyelitic enteroviruses, the methods for the detection of such viruses in water are presented. There are three phases: sample collection, concentration, with a view to reducing the volume of the sample, and inoculation in the laboratory host. Special attention is paid to concentration methods: without their application, enteroviruses can only be isolated from intensely polluted waters. Concentration methods are arbitrarily grouped into physical, chemical and biological ones; in fact they represent combinations of such methods, aimed at reaching the final purpose. Details are given as regards centrifugation, concentration in a biphasic system, adsorption (on insoluble polyelectrolytes, organic or anorganic compounds, dust, glass fibers or microfibers, gauze swabs type Moore), filtration and ultrafiltration, adsorption on yeast cells or plant extracts, etc. Schemes of combined methods are presented for the different categories of water, as well as for sediment and mud specimens. The present possibilities of the quantitative evaluation of the degree of enteroviral pollution of waters are also analyzed.

Literature data are further presented as concerns the occurrence of non-poliomyelitic enteroviruses in different categories of waters, in Romania and abroad. The studies on the presence of enteroviruses in sewage can be useful in the evaluation of enterovirus circulation among the population. Surface waters (rivers, lakes, swimming pools, the sea) often appear to be polluted, and their sediments represent important

Scanned with OKEN Scanner

accumulations of enteroviruses. The presence of enteroviruses in drinking water has been less frequently reported. It is not always possible to establish a strict correlation between viral pollution and the hygienic-sanitary indicators used for the evaluation of water quality. Some suggestions for the standardization of the presence of viruses in different categories of waters are analyzed.

Experimental studies are reviewed as concerns the survival length of non-poliomyelitic enteroviruses in different categories of waters, which demonstrates their epidemiological potential. Mention is made of the studies demonstrating the inactivating action of sea water. Finally methods are presented that allow the removal of enteroviruses from water, by physical procedures (sedimentation, adsorption, filtration) or by disinfection. Comparative evaluations are made of the efficiency of enterovirus removal from different categories of waters, stress being laid on chlorination and ozonization.

Non-poliomyelitic enteroviruses can also be propagated through the soil. The possibilities of soil contamination — especially during irrigation — are presented. Since the methods of virus detection are more laborious, special attention is paid to the choice of the objective, specimen collection and processing. Enterovirus survival in the soil depends on its geological structure, humidity, temperature, microbial flora and on the antigenic type of the enterovirus, etc. Further, dosimeter studies on the enteroviral pollution of solid residues are described.

The role of food in the spreading of non-poliomyelitic enteroviruses is undoubtedly important and it has been demonstrated by the observation of food-borne outbreaks, by the detection of enteroviruses in different foodstuffs and by experimental evidence of the considerable length of enterovirus survival in foodstuffs such as milk and milk products, meat and meat products, shellfish, plants, etc. Methods are described for enterovirus isolation from the aforementioned foodstuffs, as well as for their inactivation. A subchapter is devoted to research programmes, norms and standards in the domain of food virology.

The last two chapters review data on the presence of non-poliomyelitic enteroviruses in the air and on surfaces : possible routes of direct or indirect airborne enterovirus propagation, the presence of enteroviruses in the air and on surfaces, detection methods, inactivation possibilities, protection measures, etc.

Redactor : Lucreţia Diplan — Gheorghiu
Tehnoredactor : Silvia Deocleţian
Coperta de : C. Guluţă

Bun de tipar 26 XI 1983 Format 16/70 × 100. Coli de tipar 12. Planşe: 3 h. cretată

C. Z. pentru biblioteci mari : 576.858.23 :614.4 / 616—022.7.823.— 036.22—084
C. Z. pentru biblioteci mici : 576.858.23 :614.4

C. 203 — I. P. „INFORMAŢIA"
str. Brezoianu nr. 23—25,
Bucureşti

Scanned with OKEN Scanner

trupul tremurând rugător. Cădea singur, stors, în patul din care ea fugea, cădea parcă iar în trupul ei, care-l răscolea ca un pat de nesomn. Adormea învăluit în trupul ei, învelit în ea, încălzit, apărat, salvat, visa că se preface într-o geană a ei, într-un deget al ei, că se ascunde într-un bob al sânilor ei, că ea îl duce departe de moartea lui, închis în trupul ei de nedescris.

– Trebuie să ne căsătorim. Mergem mâine la Constanța și ne căsătorim.

– Trebuie acte. Trebuie martori. Nu se poate face totul într-o zi.

– Ce acte?

– Actele de naștere. Pe urmă, certificate de sănătate. Plămânii. Nervii. Dacă nu ai boli venerice. Care doctor ți le poate da într-o singură zi?

– Oricum, odată tot trebuie să începem. Mergem mâine la primărie.

– Actele de naștere sunt la București.

– Telegrafiem la București. Le putem primi prin poștă. De ce nu vrei, spune, de ce nu vrei? Dacă trăiam, nu te-ai fi căsătorit cu mine?

– Nu știu dacă ceva din tot ce s-a întâmplat s-ar mai fi întâmplat atunci.

– De ce? N-aș fi avut nici un haz dacă aș fi avut norocul să trăiesc? Spuneai că te-ai îndrăgostit de mine ca o femeie normală de un bărbat normal!

– Ești imposibil! Nu înțelegi nimic! Lasă-mă-n pace!

– Unde pleci?

– Jos. Vreau puțin aer curat. Îmi dai voie, nu?

– Numai cu mine.

Cum o fi iarna prin locurile astea? Seara bruma lămpile, le închidea în halouri de aer albastru și rece; asfaltul cânta lung, până departe spre sud, nota egală a luminii răsfrânte în tăria lui cenușie și violetă; lemnul verde al grădinilor de vară se sgârcea de frig; trotuarele țipau după undele automobilelor; automobilele verii, ca niște unde, ca niște fiori, ca niște femei; stuful ghiolului foșnea atât de uscat, atât de puternic, încât zgomotul părea nu natural, ci mecanic, încât te temeai ca din fricțiunea atât de uscată să nu se nască un foc.

Stătură față-n față la o masă de tablă, pe două scaune de metal și plastic, lângă o buvetă închisă din clipa aceasta și până-n maiul anului celuilalt.

– E frumos.

– Da. E foarte frumos.

– A fost frumos. Nu?

– Da, a fost frumos tot timpul.

Scaunele erau reci sub ei, prin hainele prea subțiri, îmbrăcate unele peste altele ca să țină mai cald.

– Uită-te la mare.

Scanned with OKEN Scanner

– Nu se vede.

– Se vede foarte bine.

Un val ridică fruntea albă dintre celelalte, se încordă, se arcui, sări, căzu într-o explozie de spumă pe nisip. O clipă de răgaz. Marea era foarte neagră, efectul spumei era aproape fosforescent. Alt val.

Ea nu privea marea. Îl privea pe el.

– Ce e?

– Nimic. Te iubesc.

– Ne căsătorim?

Ea deschise buzele ca pentru un oftat şi-l prinse într-o privire lichidă. Dar se stăpâni.

– Dă-mi mâna.

– Mi-e frig.

Ea purta pantaloni. Mâinile şi le adâncise în buzunarele pantalonilor. Purta o pereche de pantaloni de-ai lui. Aveau picioarele la fel de lungi.

– Am fost fericit cu tine aici.

– Da.

– Cred că am reuşit să fiu fericit, cu tine, aici. Am reuşit să-mi învingsfârşitul lângă tine, aici.

– Da.

– Te iubesc. Te iubesc foarte mult. Cum nu am iubit. Cred că într-adevăr IUBESC.

– Da.

– Ia-mă de bărbat. Dacă nu mă iei de bărbat acum, cât mai am timp, un cât de scurt timp, ca să fiu bărbatul tău, atunci am să fiu foarte nefericit.

Ea se întoarse spre mare.

– Mai nefericit decât am fost vreodată până acum. Mai nefericit decât am fost în tot acest an la un loc.

Ea se uita la mare.

– Mă auzi?

– Te aud, răspunse ea fără să se întoarcă.

– Corina.

– Da.

– Te rog.

O lovitură a vântului căzu deodată chiar între ei. Strică părul lui crescut prea lung, pieptănat cu cărare. Îl flutură lung pe al ei.

– Crezi că numai tu ai fost nefericit în acest an? Crezi că numai tu ai mai putea fi şi mai nefericit decât ai fost? De ce nu mă întrebi pe mine cât am fost de nefericită? De ce nu mă întrebi cât de nefericită voi mai fi? Eu voi fi mult mai nefericită decât tine. Tu pleci într-o clipă. Eu rămân fără tine. Nu înţelegi?

Scanned with OKEN Scanner

– Să plecăm mâine dimineață la București.

– Mi-ai spus că ai fost fericit aici.

– Să mergem la București ca să ne căsătorim. Am să fiu mult mai fericit.

Ea se uită iar la el. Foarte lung și concentrat, încât el nu-i mai pătrunse privirea.

– Bine, spuse deodată, cu oboseală în glas. Bine, să plecăm mâine.

El se ridică de pe scaunul lui, îi căzu îndată în genunchi pe treptele umede și-i îmbrățișă genunchii, dar expresia fericită i se îngrijoră de un gând nou.

– Dar vrei și tu, nu?

– Ce să vreau și eu?

– Vrei și tu, nu-i așa? Nu te silesc eu să mă iei, nu o faci din milă, spune-mi!

De frica răspunsului, îi îmbrățișă iar strâns genunchii, își lipi obrazul de coapsele ei. Îi simți mâna în păr. O clipă, fu copil sub mâna ei.

– Ridică-te de acolo. Sigur că vreau și eu. Ridică-te.

– E foarte bine așa.

– Sunt ude pietrele. Ai să răcești, ai să te îmbolnăvești.

Dar înainte ca el s-o întrebe dacă mai avea timp să se îmbolnăvească, dacă încă se mai putea îmbolnăvi, ea însăși își dădu seama de ce spusese și țipă disperată, strângându-l nebunește în brațe, mângâindu-i sălbatic cu amândouă palmele deschise cât mai larg (ca să cuprindă cât mai mult din carnea lui) obrajii, părul, umerii:

– Ah, Dumnezeule, ce-am să mă fac, CE-AM SĂ MĂ FAC?

– CORINA!

– NU MAI POT! NU MAI AM PUTERE! MĂ COPLEȘEȘTE ÎNTUNERICUL! UNDE SĂ FUG? AM SĂ MOR ȘI EU, AM SĂ MOR NEBUNĂ DE DURERE!

– TACI!

Trecu pe lângă ei un ofițer de marină cu o valiză mică în mână, îi privi, și inginerul acoperi cu palma desfăcută trăsăturile Corinei, pulverizate în explozia țipătului. Amândoi ar fi vrut, ar fi putut, ar fi simțit nevoia să plângă, să urle, să se tăvălească pe jos, să-și smulgă părul, să-și strivească obrazul pe piatra udă, să-și zdrențuiască hainele târându-se ca niște șerpi striviți, să se facă de nerecunoscut; ca să se poată măcar așa, măcar o secundă, pierde de ei înșiși.

Se stăpâniră amândoi. Se ridicară. Plecară pe malul negru, cu valuri, cu vânturi urlătoare.

Urmă iar o noapte de descompunere a ființelor. Mișcările își pierdeau înțelesul, cuvintele trezeau un râs de delir, corpurile erau ude și grele, se

Scanned with OKEN Scanner

mişcau inert, ca nişte cadavre de înecaţi. Părul ei se udase tot, de la rădăcină până-n vârful cosiţelor lungi. Spatele lui era întreg o rană de căutarea isterică a mâinilor ei. Oasele îi dureau. El nu-şi mai simţea tăria, şi-o pierduse de tot, se tocise, se sfărâmase, nu mai exista, nu mai era. Coapsele ei, şoldurile ei se învineţiseră, carnea i se muiase, se făcuse de măr bătut. Ochii li se stingeau. Corina cerea apă cu o voce pierită; el se ridica; ea – mai slabă decât el – tremura când vedea lângă obraz strălucirea paharului. Căutară un ceas, ca să vadă cât e de târziu. Îl găsiră întâi pe unul, apoi pe celălalt. Neîntoarse, stătuseră amândouă.

Ea adormi răpusă, şi el se ridică iar din pat şi începu să se plimbe în jurul patului. De unde îi venea forţa – cine ar fi putut spune? O privea. Gândul plecării îl învia. Nu mai avea răbdare până mâine. Se uita pe fereastră, pândea să prindă întâia bănuială a luminii. Între timp, o privea din nou. O iubea cu ochii: O iubea.

Ziua sosi în sfârşit. Prea obosită, ea nu se trezea. Gândindu-se la oboseala ei, se simţi şi el obosit. Atât de obosit, încât se gândi să se întindă puţin. Numai o jumătate de oră, ca să prindă puteri. Culcat lângă ea, luptă cu dorinţa de a o săruta şi învinse. N-avea rost s-o trezească din somn acum. Peste câtva timp aveau să se trezească amândoi, aveau să fie iar împreună, şi orice dorinţă i se putea îndeplini din nou.

Dricul mergea adormitor de încet. Însă, clătinat în sicriu, inginerul încerca zadarnic să adoarmă. Dimpotrivă, de câte ori se producea o oprire (ce-a ajuns circulaţia în oraşul ăsta!) simţea tot mai mult cum plictiseala i se transformă în indignare. Cât pe ce să se dea jos din raclă ca să intervină. Însă îşi amintea adevărul situaţiei lui şi se supunea iar simţului social. La un moment dat, urcând pe o stradă în pantă, convoiul păru că se imobilizează de tot. Din unghiul în care îi fusese ridicat capul, putea să vadă acum, deschizând cu multă prudenţă pleoapele, grupul cernit care se oprise şi el şi părea că dezbate o problemă. Parcă îl auzea pe Bibi certându-se cu cineva. Într-adevăr, capul lui Bibi trecu pe lângă marginea dricului, foarte aproape, şi Bibi îl privi. Inginerul îi întoarse privirea, gata să şuiere printre dinţi: „Ce paştele mă-si e porcăria asta, nu eşti în stare să pui lucrurile la punct, e nevoie să mă scol eu?", însă Bibi îi clipi liniştitor dintr-un ochi şi dipăru iar, prea repede. Mişcarea tot întârzia, Doamne, ce oameni, nici să mori la timp nu poţi în ţara asta!

Vedea acum prin filtrul genelor pe îndureraţii cei mai apropiaţi. Gina, nevasta de treizeci de ani a unchiului Vasile, de cincizeci şi cinci şi arătând

Scanned with OKEN Scanner

de şaizeci şi cinci, fără păr, fără dinţi, coşcovit de tot. Gina e pofticioasă la mâncare, leneveşte în pat, altfel cum o fi? Se uită la omul tânăr din sicriu şi se gândeşte că era mai potrivit lângă ea, între îndureraţi, jelindu-l împreună pe unchiul Vasile. Nu arată deloc bine unchiul Vasile. Oare de ce s-o fi dezumflat aşa? Pe cuvânt de onoare, singurul loc în care ar arăta la locul lui ar fi în sicriu. Biata Gina, bietul Vasile, şi deodată, har Domnului, dricul se urni.

Ajunseră cu chiu, cu vai. Tot la Sfânta Vineri, lângă rudele celelalte. Între mâinile plângătoare ale plopilor, lângă fluierele trenurilor. Slujba în capelă. Punerea sicriului pe un fel de cărucior special şi ducerea la groapă. Ultimele cuvinte ale slujbei. Bulgării. Scăderea progresivă a zgomotelor de afară, asurzite de creşterea stratului de pământ.

În sfârşit, plecară. Nu se mai auzea de sus absolut nimic. Pământul de pe coşciug începea să se aşeze în el însuşi. Din când în când, în câte-un punct interior al grămezii, un echilibru precar era înlocuit de altul mai bun. Un bulgăre se spărgea, şi pulberea lui curgea printre ceilalţi bulgări. Ţărâna bătută se bătea mai tare pe ţărâna îndesată dedesubt.

Acum, peste el curgea un vânt nesfârşit. Un nesfârşit vânt al Câmpiei Române, un vânt al acestor nesfârşite câmpii şi păduri. El trecea, trecea singur, şi tăcea din gură, credincios unei promisiuni de a nu se amesteca. Aproape, bătu clopotul cimitirului. Alt mort. Apoi o chemare de tren. Nu era rău. Era bine. Ştiu unii oameni ceva.

Slavă Domnului, am făcut-o şi pe asta, am trăit-o şi pe asta. Oricum, mai avea de aşteptat câteva ore înainte să poată ieşi fără să fie surprins de vreo privire indiscretă. Se mişcă în locul îngust, în barca de întuneric, se aşeză mai bine. O lovitură se auzi în pământul de deasupra. Încă una, mai multe, foarte multe, puhoi. O ploaie scurtă. Ce curios se aud picăturile, amplificate, normal era ca zgomotul lor să fie abia bănuit. Ploaia asta o să lipească pământul, o să-l aglutineze, o să-l facă să ţină mai bine la un loc.

Socoti că venise timpul. Poate că era încă imprudent, dar nu mai avea răbdare. Se încordă deodată şi dintr-o singură mişcare se întoarse cu faţa în jos. Bun. Mare parte era ca şi făcută. Cu penibil efort, rănindu-şi coatele, reuşi să aducă mâinile sub el. Atunci, începu să se înalţe încet în mâini, ca un cric. Spinarea îi ardea de tăria lemnului.

Cu un bufnet, pământul de deasupra crăpă. Dar tocmai atunci, forţele îl părăsiră, şi căzu la loc, ba chiar lovindu-se la faţă de fundul tare al sicriului. Încă o dată. Acum, pământul se spărsese, era mai uşor. Deodată, lumina intră peste el. Înlătură în două părţi coşciugul şi capacul, stătu în picioare în groapă, gâfâind de oboseală. Însă imediat, gândul prudent îl făcu să arunce în jur priviri speriate. O babă cerşetoare! Nici măcar prea

Scanned with OKEN Scanner

departe! Văzuse? Nu-şi putu da seama, pentru că deja alerga nebuneşte printre morminte, până când căzu la adăpost în spatele unui cavou mare, cine ştie ce familie de cavaleri de industrie o fi îngropată aici!

Poate că baba nu-l văzuse. Însă erau şanse să descopere mormântul despicat. Prezenţa lui aici devenea nesigură. Trebuia să încerce să iasă pe poarta mare chiar acum. Aşa ceva nu prevăzuse.

Se uită la el însuşi. Mama insistase să-l îmbrace în jachetă neagră şi pantalon reiat. Rămase de la un alt unchi, prăpădit în război; ideile mamei; într-adevăr, de ce să ia cu el un costum din ziua de azi, aproape nou, pe care-l puteau purta cei rămaşi? În fine, n-avea de ales. Sări gardul din fund, atent să nu-şi rupă hainele, se pierdu în dedalul de străzi înguste. Înserase de tot. Era călduţ pentru timpul ăsta al anului.

Mergea foarte repede, pentru ca oamenii cu care se încrucişa să nu-l poată privi îndelung, să observe ceva deosebit. Ieşi în Calea Griviţei. Trecând prin faţa câtorva vitrine, se uită la el însuşi. Din coada ochiului, totul părea în ordine. Se uită la ceas. Ce târziu e! Ajungea la timp acasă ca să se culce. Era foarte obosit de ziua de azi. Trecuse prin ceva prea neobişnuit. În fine, opt ore de somn reparator erau de ajuns. Opt ore, nu mai puţin, altfel mâine la slujbă era iar toropit, iar scăpa tocul din mână pe la ora două jumătate, cu două ceasuri înainte de terminarea programului.

Văzu un tramvai foarte plin, îşi făcu curaj, sări pe scară. În înghesuiala asta nu i se vedeau hainele. Se întrebă dacă nu e prea galben la faţă, atât de galben încât să dea de bănuit. Dar toţi păreau galbeni în lumina asta chioară.

De pe scara tramvaiului, care mergea destul de încet, văzu o femeie pe trotuar. Tramvaiul o ajungea, o depăşea. Era înaltă şi albă, mergea frumos. Când trecură de ea, se răsuci pe scara tramvaiului, ca s-o poată vedea în faţă. Faţa îi era destul de închisă. Bronzată de soarele verii trecute. O recunoştea. Cine era? O cunoştea într-adevăr? Viteza crescândă a tramvaiului îl îndepărta de ea. Parcă vedea o secvenţă dintr-un film în care juca o actriţă necunoscută, însă semănând bine cu o femeie pe care-o cunoştea.

Viziunea se risipi.

– Corina! strigă el, şi camera de hotel îi răspunse cu golul ei.

Nu era în baie. Nu era nicăieri. Unde era? Unde-i erau rochiile? Unde-i erau lucrurile?

– Doamna v-a lăsat asta când a plecat, spuse fata de la recepţie, şi îi întinse un plic.

– A PLECAT?

Numai câteva cuvinte. „Iartă-mă. Te iubesc. Te voi revedea".

Scanned with OKEN Scanner

Şi numele ei. Numele ei, pe care-l citi, îl reciti, îl reciti, îl mai citi o dată, simţind că înnebuneşte.

– Aveţi o maşină care pleacă la Constanţa chiar acum?

– Dane! strigă fata de la recepţie, întorcând din drum un flăcău de doi metri înălţime şi de unul şi jumătate lăţime.

– Ce e?

– Pleci cu autobuzul la Constanţa?

– Peste zece minute.

– Îl iei şi pe domnul.

În zece minute, inginerul plăti hotelul şi se schimbă. Coborî fără valiză, pentru că nu mai avusese timp să şi-o facă.

– La ce adresă să vă trimitem lucrurile?

– La... Dar nu era capabil să-şi mai amintească propria lui adresă. Nu mi le mai trimiteţi.

– Ce să facem cu ele?

– Ardeţi-le.

Cât ai clipi din ochi, fu la Constanţa, zbârnâind pe şosea în autobuzul imens şi gol, lângă şoferul imens, fu la gară, se repezi la bilete.

– Rapidul Tomis?

– Rapidul Tomis nu mai merge, s-a terminat sezonul.

– Alt tren care să facă numai două ore până la Bucureşti nu mai e?

– Nu.

– Atunci, daţi-mi la primul.

În aşteptarea trenului, îşi legă şireturile la pantofi. Era foarte puţină lume în tren. Căzu pe spate pe una din băncile unui compartiment gol.

Nici măcar nu putea fi sigur că plecase la Bucureşti. Dar unde în altă parte ar fi avut vreun sens să plece? Recitea biletul ei, şi până şi felul în care erau rotunjite literele îl ardea până-n fundul inimii.

Unde avea să-l revadă? Când? Intrară în compartament doi indivizi bătrâni şi bărboşi, unul dintre ei aprinse o pipă, începură să vorbească cu glas scăzut despre ale lor.

Nu era în stare să se gândească la nimic. Tot citind biletul ei, îl făcu până la urmă bucăţi. Adună bucăţile şi le puse în buzunarul de la piept. Apoi începu să le scoată de acolo, să le aşeze lângă el, potrivindu-le, până când frânturile recăpătau sens.

– Am fost închis zece ani, spunea bărbosul cu pipă. Dintre care, un an şi jumătate am tot stat încadrat la litera H. Ştii ce-i asta? Paragraful H? Pedeapsa cu moartea. După aia am luat zece ani. Pe urmă s-a constatat că a fost o eroare judiciară.

Scanned with OKEN Scanner

– Ce să-i faci, erori se întâmplă mereu şi peste tot. Ştefanopol e un nume foarte grecesc.

– Ei, grecesc! Noi suntem români, domnule, mai români ca noi nu se află! Mama, Dumnezeu s-o odihnească, era născută Xifando. Dar era româncă sadea, grecesc era doar numele. Aşa şi tata.

– Ce-o fi cu via asta de a rămas neculeasă?

– N-or fi având mână de lucru. Afară doar dacă n-o fi şef vreun inginer agronom prea tâmpit. Ia stai! Pe-aici pe undeva am lucrat şi eu, la un culesc de vie, când eram închis.

– N-o fi chiar asta?

– S-ar putea, nu mai ţin minte. Şi cum îi zicea am uitat.

– Era frumos la cules?

– Grozav. Dar eram prea puţini. Asta e o operaţie care nu se poate face decât manual. Maşini de cules via nu s-au inventat.

– Şi rămânea neculeasă?

– Ba bine că nu! În anul ăla, că era o vie mare de tot, au rămas neculese o sută de hectare de vie. O sută de hectare! Îţi dai seama? Vagoane şi vagoane de struguri!

– Trebuie să fi fost îngrozitor timpul cât ai aşteptat sentinţa. Mai ales dacă o aşteptai pe cea capitală.

– Ajunsesem la patruzeci şi două de kilograme. Ce vrei, toate dovezile erau împotriva mea. Pe urmă am stat zece ani nevinovat printre borfaşi şi asasini adevăraţi. Ei ispăşeau ce făcuseră. Dar sunt pe pământul ăsta atâţia care pătimesc nevinovaţi, şi n-au cum să-şi arate nevinovăţia. Trec printr-o pacoste. Nu plătesc că au făcut ori au crezut ceva. Aşa trăieşte omul şi cade pacostea pe el din cer. Şi asta întotdeauna s-a întâmplat şi întotdeauna se va întâmpla.

– Pe la via aia ai mai fost?

– Nu.

– Ce s-o fi făcut cu strugurii pe care nu i-au cules?

– Habar n-am. S-or fi făcut stafide pe araci. Şi tocmai în anul ăla inginerul-şef a încasat patruzeci de mii de lei. Patruzeci de mii. Ca primă personală. Pentru cât de bine a administrat el via.

– Cum aşa?

– Păi uite-aşa, că numai el ştia cât poate să producă via, şi a fost prevăzător şi şi-a fixat nişte cifre de plan mult sub posibilităţile ei. Le-a depăşit cu sută la sută, chiar aşa, cu o sută de hectare rămase neculese, şi toată lumea a zis: Bravo, ce om muncitor!

– De necrezut!

– Câte sunt de necrezut şi se întâmplă!

Scanned with OKEN Scanner

Iartă-mă, te iubesc, te voi revedea, Corina, iartă-mă, te iubesc, te voi revedea, Corina. Când, Dumnezeule, când? Corina, unde eşti, de ce-ai fugit, cu ce-am greşit până şi în faţa ta? Intrară într-o ploaie sub care îi aştepta Bucureştiul.

Nu o putea căuta decât în câteva locuri. Şi nu o găsi în nici unul dintre ele.

Sub ploaie nu mai recunoştea oraşul. Ce oraş e ăsta? Bucureşti? Ce nume e ăsta? În după-amiaza neprietenoasă, taxiul alergă de colo-colo, apoi obosi de drumuri fără rezultat şi-l duse acasă.

Acasă! Praf, miros de închis, de lipsă de căldură omenească, deschise toate ferestrele, aprinse toate luminile, îşi trase scaunul în faţa ferestrei spre oraş, puse un pahar plin pe pervaz, se aşeză. În jurul paharului, oraşul sclipea de roua multicoloră. Îl amesteca ploaia. Toate ca de obicei. Ultimul „de obicei". Îi veni să plângă cu hohote de mila lui, dar nu vru să plângă, nici nu putu, se întrebă dacă-i venise cu adevărat. Nu, nu-i venise, era un impuls care nu-i aparţinea. Însă, prea cunoscut fiindu-i, şi-l aplicase mecanic şi lui.

Scoase o altă foaie de hârtie albă din teancul neatins, găsi un creion, scrise:

„N-am să semnez nici la început, nici la sfârşit; şi fără nume, textul tot al meu rămâne; iar viaţa şi moartea nu se împiedică de numele meu.

Poate că mi se va naşte un copil. Pot interpreta astfel sensul frazei «Te voi revedea». Mă va revedea în ceva, obiect sau fiinţă. În ce m-aş putea oglindi mai bine decât într-un copil al meu?

Corina, iubirea mea mare, nu-ţi pot lăsa prea multe cuvinte. Tu mă vei trăi pe mine mult mai adânc şi mai înalt decât am putut eu însumi să mă trăiesc.

În faţă nu văd nimic, în spate nu las nimic, nu văd nimic. Trecutul vieţii şi viitorul morţii sunt probabil amândouă prea aproape ca să mai poată căpăta chip. Alţii în locul meu le-ar putea descrie cu prisosinţă. Eu trebuie să pun punct.

Viaţa a fost, pe câte-mi amintesc, minunată, a făcut toţi banii, tot creierul, tot sângele, tot pământul şi cerul câte am putut eu cheltui într-un număr de ani atât de mic."

Se opri, sorbi ultima oară din pahar. Privi oraşul. Se desfăcu la gât, îşi scoase crucea de aur.

Scanned with OKEN Scanner

„Aş fi vrut ca picătura asta de aur să cadă în mâinile copilului meu. Poate se va întâmpla chiar aşa. Toate celelalte lucruri pe care le las sunt cu totul obişnuite şi orice om e demn de ele. Plecând, am senzaţia că toţi oamenii care rămân după mine sunt mai tineri decât mine. Am senzaţia că toţi oamenii rămaşi sunt copiii mei. Chiar mama copilului meu mi se pare, straniu, că ar fi fiica mea. Aş vrea să las ceva mai de preţ copiilor. Dar ce? N-aş îndrăzni să-i binecuvântez, căci mă îndoiesc că moartea mea îmi dă o singură fărâmă de har."

Se mai gândi, aproapie iar creionul de hârtie, îl ridică. Asta era tot. Mai departe nu putea merge. Puse cruciuliţa de aur pe cuvintele pe care le scrisese. Se ridică, se uită prin fereastră în oraşul lui.

Cum rămâne cu toate astea? Ce se va întâmpla cu ele?

Deznodământul era aproape, dar nu-l simţea apăsându-l. Curios, pentru că acum câteva ore avusese o stare insuportabilă în tren. Simţise că moare înainte de a ajunge. Culcat pe bancă, lângă sporovăiala celor doi, nu se putea mişca, se sufoca, inima îl făcea bucăţi, avea febră. Îşi luase singur pulsul şi înlemnise: avea o sută optsprezece bătăi pe minut. Corespondentul a patruzeci şi unu de grade febră. Privirea tavanul vagonului, ştia că nu poate împinge timpul, simţea că nu mai poate respira, bolovani îi apăsau capul şi pieptul. Îi venea să se ridice, să iasă în coridor, să se agite, să urle. Era convins că dacă s-ar fi sculat să dea din mâini şi să răcnească, moartea s-ar fi îndepărtat. Dar nu se putea ridica. Apoi venise gândul copilului.

Acum, fiziceşte era slab. Sufleteşte nu-l apăsa nimic. Mai nimic. Amintirile vagi. Corina, iubirea, durerea, amintirea, mântuirea mea. Şi oraşul ăsta. Frumuseţea asta de oraş, viaţa şi moartea asta de oraş, boala de care suferise el de când se născuse între case şi străzi, Bucureştiul lui, prea frumos ca să i se mai vadă frumuseţea, prea dulce ca să i se mai cunoască gustul. Ce avea să rămână din el după moartea lui? Ce avea să rămână chiar din ţara înconjurătoare, mică, grea, ascunsă, dureroasă, veche, întinsă din începutul timpului până-n sfârşitul lui? Tot atât şi din oraş, şi din ţară, nimic mai mult, prea puţin mai puţin.

O, Bucureştiul, orchestra solemnă a îngerilor cu cap de muritori, roată nebunesc învârtită de timp şi spaţiu, luciu de ochi de fiară în zăpada lumii, palmier al Balcanilor, nebunie de soare alungat de nori, treaptă spre cer, prăpastie spre inima omului, floare de sânge a ţărânii din jur, mă duc în tine, mă scufund în tine, fără să ştiu de ce ori cum, fără să-mi înţeleg dispariţia, singur, tânăr, român, cad pe nicovala ta, mă fac praf sub ciocanele tale, mă risipesc ca un fum sub luna oraşului, nu mai sunt. Mă uit la tine cu durerea ochilor, până sap cu privirea tunele în casele şi oamenii tăi, doar-doar te-aş putea lua cu mine, doar-doar m-ai putea duce

Scanned with OKEN Scanner

cu tine. Undeva trece o stradă, călcând cu picioarele ei de aur pe inima ta, pe inima mea, o femeie în care ai să mă regăseşti, deasupra fantasticul cer al oraşului înţelege mai mult decât mine. Străzile nu sunt drepte niciodată, casele nu sunt aşezate niciodată în aceeaşi linie, ci mereu de vârste, culori, mărimi, stiluri, frumuseţi şi urâţenii diferite, încât tot oraşul e o istorie a lumii şi a mea, în care fiecare nuanţă vieţuieşte cu celelalte. Ruperea pe asfalt a unui automobil, ca ultima picătură de sânge care se mişcă într-o vână. Timpul căderii a sosit. Într-o casă e o carte din care am citit de mult, pricepând puţin, uitând repede, nişte cuvinte ca: „Eu sunt viaţa, voi mlădiţele. Cine rămâne în Mine şi în cine rămân Eu aduce multă roadă; căci despărţiţi de Mine nu puteţi face nimic." Le-am uitat. Dacă le-aş fi ţinut minte, poate altfel ar fi fost totul acum. Cred însă că erau *frumoase*. Încrederea în *frumuseţea* lor, nici moartea nu mi-o poate doborî.

Era târziu. Se duse şi descuie uşa apartamentului. Spargerea ei a doua zi n-ar fi avut rost. Se uită să vadă dacă totul rămâne în bună rânduială. Apoi stinse toate luminile. Risipa nu e bună niciodată, aşa că de ce ar fi fost bună tocmai acum? Veni la fereastră şi mai bău o dată în ochi veşnicia oraşului. Răcoarea luminilor, gustul culorilor ameţeau privirea. Apoi ieşi pe fereastră. Chipul, întors spre acoperişul de văzduh al oraşului, nu mai era al lui de atâta adâncime.

Făcu primii paşi cu o infinită prudenţă. Dar aerul îl susţinea, aşa că după câteva minute curajul îi spori, merse mai energic şi mai repede, şi în mersul lui începea să se ghicească o direcţie, un scop. Pe străzi erau oameni puţini, grăbiţi să ajungă acasă în ora târzie, nimeni nu privea în sus, ca să-i observe mersul aerian. El trecu printre case, de-a lungul etajelor, dedesubt oraşul gonea în timp, cu imposibila lui viteză care se judecă în vieţi de om, totul frumos şi de necrezut, în uimirea lumii. Continuă, cu paşi siguri în cerul răcoros al nopţii, până când începu să se îndepărteze, să se vadă tot mai indistinct, dispăru de câteva ori, reapăru în orizontul inegal al oraşului, dispăru iar, noaptea respira paşnic, somnul ei pregătea o zi, pe cer nu se vedea nimic.

Februarie 1969

Scanned with OKEN Scanner

POSTFAŢĂ

ZEU PRINTRE BLOCURI

"Noi suntem copiii marelui oraş,
Bronzaţi în fum de case, uzini şi maşini,
Făcuţi din lumini şi asfaltul pe care mii de pantofi
De toate felurile strivesc ţigări în fiecare zi."

Cu astfel de versuri debuta Petru Popescu, în 1961, pe când era încă student, spre satisfacţia prefaţatorului său - criticul literar Paul Georgescu - un citadinist, care striga atunci, în paginile pe care i le dedica, un fel de "Evrika!". Chiar titlul cărţii de debut - în colecţia atât de iubită şi ea, pe atunci, "Luceafărul", apoi desfiinţată - era opţional şi sfidător: *Zeu printre blocuri.*

Petru Popescu îşi făcea intrarea în literatură fără dibuiri, ca Athena cu coiful pe cap şi cu lancea în mână, ştiind ce vrea de la literatură şi fiind încântat, ca orice adolescent superior, de ceea ce reprezenta ca aspiraţie spirituală:

"Ei da, mă iubesc şi de grijă îmi port,
Îmi plac mie însumi şi-mi place oglinda
Că ea m-arată înalt şi plin de idei.
Dar viaţa mea sunt eu, singur cu mine trăiesc,
Numai cu mine, legat de aceeaşi bancă a galerei,
Numai pe mine mă pot bizui, numai eu
Sunt cel care mă poate ajuta, şi n-aş fi oare sperjur
Să nu cred, să nu mă apăr şi să nu-mi dărui singur iertarea?"

Este sigur că Petru Popescu a avut o intrare spectaculoasă în literatură, sonoră, plină de ecou şi de urmări însemnate. Ceilalţi debutanţi, de vârsta lui, respectau alte tipicuri, alte simboluri şi alte tradiţii. Lumea de asfalt a oraşului era, în general, prea puţin iubită în literatura română. Îţi trebuia multă decizie să-ţi afirmi preferinţa citadină şi să consideri universul oraşului un univers frumos şi încântător. Petru Popescu a făcut-o, distingându-se imediat de colegii lui de generaţie, prin voinţa disocierii. Se simţea posesorul unui apel nou, căuta să schimbe mentalităţile curente, afirmând, cu trufie juvenilă, propriul *eu* dedicat propriei vocaţii şi unui univers modern. Reperele literaturii moderne anglo-saxone, abia întrezărite în România anilor '60 postbelici, i-au fost modele de căpătâi. Spiritul critic al tânărului scriitor, al cărui nume,

Scanned with OKEN Scanner

apărea pe coperta unui volum încă de pe băncile facultății, a acționat rapid. Ca orice tânăr sigur de sine nu s-a sfiit să atace glorii constituite. Una din gloriile benigne ale vremii era poetul A. E. Baconsky, care se lepădase de poezia reţetardă şi oficioasă a vremii, păşind către o poezie căutată, vădit estetizantă şi calofilă. A. E. Baconsky milita pentru deschiderea literaturii române către cele mai inedite şi moderne universuri literare, din toate punctele cardinale, tipărind în *Contemporanul* o serie de traduceri din lirica universală, care constituia, în cercul încă închis al literaturii postbelice din România, o primenire şi o şansă de cunoaştere. Petru Popescu a examinat cu fineţe, folosind un adevărat bisturiu pentru analiza traducerii, exactitatea de sens, fidelitatea faţă de original a versurilor în cauză, voind să spună că "împăratul e gol". Regele n-a fost însă detronat. Ar fi fost şi nedrept. A. E. Baconsky şi-a continuat aplaudata lui campanie de traducător din toate literaturile lumii, iar tânărul şi-a adăugat galonul dorit, prin care se arăta lumii aşa cum era: o personalitate dinamică, puternică, capabilă de expresie publică plină de efect, în straiele unei competenţe impunătoare. Tânărul înalt şi sociabil, tobă de carte, încerca, fără aroganţa reală, să-şi impună legea.

Îl ţin minte din începutul lui 1968, când umbla prin clădirea din Kiseleff, unde era pe atunci Uniunea Scriitorilor, împreună cu Dumitru Ţepeneag, oferind scriitorilor veniţi la casieria de la subsolul instituţiei, textul unui protest, împotriva ocupării Cehoslovaciei de către trupele sovietice şi cele ale ţărilor socialiste, minus România. Protestul a fost semnat mai ales de tineri - gest cu totul excepţional pentru acele vremuri - şi poate fi găsit în revista *Gazeta literară*, în facsimil. Semnătura lui Petru Popescu este, dacă nu mă înşel, prima, lângă D. Ţepeneag, însoţită de alte câteva, mai ales de scriitorii din generaţia nouă, între care şi autorul acestor rânduri. Semnatarii aveau credinţa eficacităţii morale a protestului lor, iar apariţia lui în presă îi sporea mesajul. Mai târziu - nu foarte târziu! - cu un alt protest, semnat cam de aceeaşi tineri, s-a întâmplat altfel. Dar aceasta este altă poveste, pe care şi-o pot aduce aminte mult mai mulţi. În alte prilejuri, Petru Popescu s-a înfăţişat ca un veniamin, ca un copil aşteptat al literaturii române şi o vreme s-a putut răsfăţa în această postură. Dar răgazul n-a fost foarte lung. A durat atât timp, cât incomodul debutant, amabil şi conversativ, a arătat că apariţia lui la orizont, şi mai ales declaraţiile pe care le făcea, nu veneau doar din beţia unei vârste, ci din consistenţa unei verticalităţi, a unei conştiinţe ultime, a unui program şi a unei voinţe de afirmare. Tânărul care tipărise *Zeu printre blocuri* (1966) şi *Fire de Jazz* (1969) era o pasăre rară, în curs de definire. A intrat şi el în şuvoiul de adversari literari ai *Luceafărului* şi ai lui Eugen Barbu (ca mentor căpcăun) care-şi devora proprii fii, pe care-i lansase şi pe care, de fapt, îi iubea în felul său ursuz. Cenaclul pe care-l prezidase, *Luceafărul*, lansase mulţi tineri talentaţi, care intraseră, apoi, în conflict cu cel care-i aruncase în arenă. Cel mai incisiv articol despre volumul

Scanned with OKEN Scanner

Măştile lui Goethe de Eugen Barbu a fost scris de Petru Popescu. Chestiunea avea să iasă din sfera simplului joc al republicii literare, căpătând la un moment dat şi o injecţie de confuz element politic, lucru de care prea puţini şi-au dat seama în acea vreme a speranţelor literare şi mirajelor politice, exprimate atât de spectaculos prin Primăvara de la Praga şi prin protestul românesc la ocuparea Cehoslovaciei de către armatele înfrăţite ale Tratatului de la Varşovia, din care lipseau însă trupele româneşti. Petru Popescu a trăit şi el satisfacţiile şi speranţele noii generaţii, iar curba literaturii lui, năzuinţele şi cariera autorului rămân grăitoare pentru frumoasa deschidere, dar şi pentru declinul care i-a urmat. Nici tânărul atât de aplaudat n-a mai fost apoi primit cu aceleaşi aplauze. Sociologia succesului literar îşi poate face din Petru Popescu un studiu de caz.

Cercurile literare, publicul iubitor de literatură, începeau să trăiască în anii '60 satisfacţia unui orizont de aşteptare împlinit. Setea de normalitate tindea către o reînnodare a climatului literar de altădată, o tradiţie de liberă iniţiativă şi inspiraţie. Erau gesturi consacrate, care rămăseseră în memoria colectivă, pe care cititorii de literatură le aşteptau. În istoria vieţii literare se clădise tradiţia venirii la Bucureşti a ardelenilor şi la intrarea lor în literatură aici, ca expresii ale energiei creatoare tipice şi ale firescului. Faptul s-a şi petrecut în anii '60 şi a dat un sentiment de normalitate. Înaintea apariţiei acestor tineri din Ardeal, care a fost un eveniment aplaudat, s-a mai produs unul care a corespuns aceluiaşi orizont de aşteptare. Literatul şi cititorul rămâne deprins ca izbucnirile de mare talent să-i vină dinspre Ţara de Sus a Moldovei, teritoriul îndepărtat al harului. Faptul s-a şi produs atunci, când toate izvoarele de înoire păreau sleite. Din acest Nord românesc a coborât Nicolae Labiş cu căprioara lui sacrificată. Poetul Nicolae Labiş a însemnat mai mult decât o simplă apariţie literară. Intrarea lui în literatura română a ţinut de un fel de scenariu sau ritual literar subconştient. Aşa s-a întâmplat şi cu apariţia la Bucureşti, în cenaclul revistei *Luceafărul* şi pe băncile facultăţii bucureştene a tinerilor ardeleni, ca mesageri ai marelui val liric postbelic: Ioan Alexandru, Ana Blandiana, Gheorghe Pituţ, Ion Pop. Vechi izvoare dădeau semn că îşi descătuşează şuvoaiele. Toţi au făcut ulterior o carieră remarcabilă în poezia românească. Au apărut apoi şi "moldovenii", Cezar Ivănescu, Dan Laurenţiu, Ioanid Romanescu, Mihai Ursachi, Mircea Ciobanu, alte stele ale consfinţirii unei tradiţii de energie creatoare. Din altă direcţie, Petru Popescu a reprezentat şi el acelaşi fenomen auroral. Dacă Nicolae Labiş, cu urmaşii săi moldoveni şi tinerii ardeleni se desenau pe ecranul aşteptării colective ca heralzii unor universuri mitice bine întipărite în subconştientul colectiv, Petru Popescu venea dintr-o tradiţie mai apropiată, totuşi destul de precis desemnată, în ciuda traumelor produse după război de represiunile regimului şi culturii de ocupaţie. El venea din lumea intelectuală bucureşteană, din inima unui univers sufletesc şi intelectual căruia i-a dat contur seria de amintiri a lui Mircea

Scanned with OKEN Scanner

Eliade şi, recent, amintirile fratelui lui Dinu Lipatti, Valentin Lipatti. A fost un Bucureşti harismatic între cele două războaie mondiale, unde au înflorit idei şi s-au modelat talente şi vocaţii, un Bucureşti generos şi miraculos despre care s-a vorbit prea puţin, dar care rămâne un Bucureşti recuperabil în memorie şi în sfera valorilor ideale. Deşi tăvălugul istorico-politic, care a trimis în puşcării nenumăraţi cărturari români de mare valoare, a lovit tocmai această viaţă vie a fraternităţii sufleteşti şi ideatice, nucleul, forţa lui a supravieţuit şi, în fosta cetate dâmboviţeană, a generat energii şi talente noi. Spre deosebire de confraţii de generaţie a căror origine socială şi culturală ţinea mai ales de tradiţia categoriilor neorăşeneşti, cel mult a periferiilor, Petru Popescu venea dintr-un Bucureşti axial, ticsit de amintiri culturale şi artistice, dominat de superbe tentative şi realizări. Tatăl său, Radu Popescu, om de stânga, gazetar cunoscut şi cronicar de teatru redutabil, reprezenta şi el, din plin, această lume. În casa în care a crescut Petru Popescu, chipul lui Eugen Ionescu era o prezenţă familiară, într-o fotografie cu dedicaţie. Ieşit din acest mediu, Petru Popescu constituia o expresie de lux a talentelor şi ambiţiilor culturale ale burgheziei bucureştene de altădată, geloasă de propriul ei trecut, la care n-a voit să renunţe în ciuda prigonirilor şi represiunilor. Mediul cărturăresc bucureştean, supravieţuitor, explică alchimia care a produs exemplarul de excepţie care a fost şi este Petru Popescu, năvălit elegant în literatură, cu toate armele în bandulieră, amintind unora de agresivitatea programatică a lui Petru Dumitriu. Era evident că venea dintr-o altă direcţie decât majoritatea colegilor lui tineri şi era de presupus că se va produce o ciocnire de mentalităţi şi de aspiraţii între acest "zeu al citadinismului" şi ceilalţi hărăziţi chemaţi de misterul naturii şi de miturile ruralităţii. Spre deosebire de unii dintre aceştia, Petru Popescu era, în egală măsură, omul concepţiei şi al creaţiei, disponibil atât teoriei, cât şi în planul propriu zis al creaţiei, fiind un scriitor elaborat, cu atuurile scriitorului total. Din păcate, atacurile le-a primit din cercurile cu afişata pretenţie de intelectualitate.

Autorul *Zeului printre blocuri* şi-a construit cariera literară, fără a-i calcula, desigur, toate pericolele. După exerciţii interesante de proză modernă - inspirate de lecturile anglo-saxone, care-i străjuiau în primul rând scrisul - Petru Popescu a debutat cu un roman, *Prins*, care i-a adus rapid celebritatea, ceea ce i-a pus pe gânduri pe prozatorii mai vârstnici. Nu era vorba numai de tema cărţii şi de calităţile ei romaneşti, ci şi de faptul că, prin acest roman, scriitorul, s-a afirmat, fără ezitări, ca un romancier marcant şi şi-a tăiat din marea masă a cititorilor o felie impresionată. De la acest roman, Petru Popescu şi-a avut publicul său, un tânăr public compus din liceenii mari, mai ales, dar şi din studenţii primilor ani de facultate. A fost un public care şi-a iubit scriitorul, căruia i-a acordat toată încrederea, susţinându-l moral. A fost un schimb, o reciprocitate. Era un fenomen aproape nou.

Scanned with OKEN Scanner

În anul în care apărea *Prins* (1969), puţini scriitori se puteau lăuda că au publicul lor, că au cucerit, prin problematică şi stil, categorii largi şi precise de cititori. În această situaţie se găseau, după ani de contacte cu cititorii, doar Petru Dumitriu (despre care nu se va mai vorbi, fiind scos din scenă după 1960, anul plecării acestuia în occident), Marin Preda - datorită prozei sale cu univers ţărănesc, şi predilecţiei pentru o problematică psihologică nouă -, Eugen Barbu - altă figură intrată zgomotos în literatură cu ajutorul unui roman şoc: *Groapa*. După cât se poate vedea, ca profil, autorii sunt diferiţi, iar explicaţia constituirii publicului lor diferă. Petru Popescu a ocupat un loc gol în mintea amatorilor de literatură şi a fost la fel de aplaudat de fanii săi şi pentru romanul *Dulce ca mierea e glonţul patriei* (1971). Autorul aducea şi un mod direct de adresare, prefera realităţile cotidiene, respingea stilul ceremonios şi acest lucru îşi avea desigur rolul său în impunerea prozei pe care o scria. Acest public special, care a însoţit toate cărţile lui Petru Popescu de proză, a devenit ulterior, după dispariţia lui Petru Popescu de pe scena literaturii române, publicul cenaclurilor literare conduse de Adrian Păunescu, cenacluri care atunci se constituiau pentru a deveni mai apoi întâlnirile de pe stadioane, şi care în faza lor primă erau foarte apropiate de literatura vremii, de poezia şi de proza recitabilă.

Petru Popescu era un scriitor lucid, care-şi căuta temele şi publicul în mod cerebral. Avea o teorie despre literatură, despre proză, încercând să implanteze în mentalitatea lumii literare româneşti o altă atitudine faţă de scris. De fapt, Petru Popescu se întorcea la profesiunile de credinţă ale lui Mircea Eliade, când era vorba de proză. Făcea teoria faptului comun ca materie a prozei, a oamenilor cei mai obişnuiţi, a prozaismelor curente, ca materie de lucru, a lipsei de stil chiar, ca stil, a renunţării la vocabularul supravegheat atunci când acesta ameninţă să devină inexpresiv, a preluării vocabulelor crude din limbajul cel mai obişnuit. Cu alte cuvinte, Petru Popescu propunea o altă proză, decât cea care se găsea în mod curent pe rafturile librăriilor şi pe mesele de lucru ale scriitorilor. A tipărit o carte întreagă de comentarii literare *Între Socrate şi Xantipa* (1973), unde sunt cuprinse aceste teorii şi declaraţii scriitoriceşti, care ni-l înfăţişează ca un scriitor rotund, încercând să fixeze imaginea unei literaturi cu urgentă nevoie de înnoire. Se plasa conştient în prelungirea literaturii române interbelice şi a manierei experimentale a acesteia, reperul fiind Mircea Eliade. Romanele lui dintâi, *Prins* şi *Dulce ca mierea e glonţul patriei* au fost expresia promptă a acestor teorii. El este înainte-mergătorul unei proze scrise de o generaţie ulterioară, care s-a afirmat prin anii '80, prin propensiunea către realităţile cotidiene, minore, către situaţiile faptului divers. Petru Popescu le-a fost deschizător de drum, fermecat, însă, de magia romanului şi a povestirii. Romanele următoare *Sfârşitul bahic* (1973) şi *Copiii Domnului* (1974) sunt o ilustrare a acestui program. Succesul general al înoitorului începea însă să se

Scanned with OKEN Scanner

bifurce. Rămâne cu publicul său, dar îşi pierde o parte a criticii. Cărţile lui sunt rău primite, tratate ca exprimente neglijente şi lipsite de decenţă. A fost mai ales cazul *Sfârşitului babic*, dar era vizibil că un cerc de opacitate se închidea şi se strângea în jurul tânărului scriitor care-şi manifestase pe toate planurile independenţa, care avea o evidentă cultură nonconformistă şi mai ales succes.

Alţi romancieri îşi puneau problema de a cuceri şi ei publicul lui Petru Popescu, de a intra în competiţia dialogului romancier-public, pe terenul propus de acesta. Cu alte cuvinte, noul venit avea o remarcabilă influenţă în toate mediile: cele ale cititorilor şi cele ale elitei care se adresa cititorilor. Istoria victimizării lui Petru Popescu se va face mai târziu cu detaşare. Ea a fost publică şi fără mari ascunzişuri. Provine dintr-o orbire literară, în primul rând. Este o expulzare a celui care nu seamănă cu ceilalţi. Momentele efuzive şi entuziaste ale începutului trecuseră. După ele scriitorul îşi văzuse de drumul său propriu. Acest drum se ciocnea de alte viziuni literare, de alte interese.

A existat întotdeauna un gregarism al cercurilor literare şi artistice, care a funcţionat mai ales împotriva scriitorilor de succes. Petru Popescu s-a izbit de aceste gregarisme pentru că era singular şi pentru că propunea o altă cale decât aceea a majorităţii. Un biograf unic al lui Alexandru Macedonski, Adrian Marino, ne-a vorbit cu inteligenţă şi, desigur, documentat despre adversitatea cu care era privit acest scriitor citadin şi modern într-o epocă literară a ruralilor. Ceva de această factură a funcţionat şi în cazul izolării şi respingerii lui Petru Popescu. Precizarea este însă că actele critice care au încercat să-l stigmatizeze n-au venit din această direcţie, dovedind opacitatea gestului critic. Prozatorul şi poetul o luase înaintea criticilor săi. Ulterior, Petru Popescu, care n-a cedat uşor, a avut de suportat contactul cu îngustimi şi mai supărătoare. Cercurile politice cu care a intrat în contact nu i-au deschis nici ele o perspectivă favorabilă, ci mai ales o închidere de orizont. Era o direcţie de acţiune, în care scriitorul făcea o prospecţie, pipăind terenul într-o documentare continuă în favoarea operei pe care avea de gând s-o scrie. Înaintea expatrierii proiecta un roman despre Mărăşeşti, în care ar fi trebuit să intre şi ceva din mănunchiul unor amintiri de familie. Literatura română a rămas fără acest roman.

Modul în care valul atât de promiţător al tinerilor scriitori care au debutat, după război, în a doua parte a deceniului 7, a fost abătut şi disipat, va constitui o temă interesantă cel puţin pentru memorialişti. Îndrăzneţi şi ofensivi aceşti tineri s-au remarcat prea nrepede şi au fost devreme reperaţi de forţele interdictive şi inerţiale. Mă gândesc, de pildă, la Dumitru Ţepeneag, la Paul Goma, la Vintilă Ivănceanu, şi, desigur, la Petru Popescu fără a epuiza şirul celor asemenea lor, între care "oniricii" alcătuiau un grup caracteristic. Unii dintre aceştia fuseseră găzduiţi de cenaclul revistei *Luceafărul*, unde produseseră o adevărată insurecţie. În viaţa literară, erau consideraţi un grup

Scanned with OKEN Scanner

independent şi de iniţiativă. Gesturile lor, băteau însă mai departe decât ar fi dorit-o unii colegi, mai vârstnici sau destul de apropiaţi ca vârstă, pentru a nu mai vorbi de oficialităţile pentru care asemenea tineri deveneau cu totul indezirabili. Procesul de eroziune complexă la care au fost supuşi a dat rezultatele cunoscute: mai devreme sau mai târziu cei mai activi reprezentanţi ai acestui val juvenil şi promiţător pentru literatura română au luat, vrând nevrând, drumul străinătăţii. Conferinţa scriitorilor din 1972 a pecetluit aceste destine. Trecerea de la *adunare generală* a scriitorilor la o *conferinţă cu delegaţi* a constituit calea prin care indezirabilii zilei să fie eliminaţi de la dreptul lor de a vorbi de la o tribună colegială la care aveau tot dreptul. În aceste alegeri planificate au fost eliminaţi cu deliberare cei nedoriţi (Nicolae Breban, Dumitru Ţepeneag, Paul Goma şi alţii), din păcate cu concursul scriitorilor din conducerea Uniunii Scriitorilor care a acceptat stratagema, renunţând la dreptul fiecărui scriitor de a se reprezenta singur la marea întâlnire profesională pe ţară. Dacă Petru Popescu a trecut acest baraj sau nu, nu mai ţin minte, dar el a plătit mai târziu juvenila sa insurgenţă şi proaspătul său prestigiu literar de tânăr scriitor care voia să fie el însuşi în literatura română şi în viaţa literaturii. Această renunţare scriitoricească la un drept câştigat, dreptul de adunare generală a literaţilor, a fost plin de consecinţe pentru dezvoltarea literaturii româneşti, ca şi pentru evoluţia lui Petru Popescu. Eliminarea lor - pentru că asta a fost - era rezultatul unor interese conjugate ale unor cercuri politice şi cercuri culturale.

Peste hotare, Petru Popescu, fiind un anglist remarcabil şi proteic, inteligent, talentat, şi-a compus o altă carieră cu destulă strălucire. E un caz de scriitor român transmutat, care va fi şi el examinat de istoricii literari, când se vor hotărî s-o facă, alături de Panait Istrati, de Petru Dumitriu, Petre Neagoe, Vintilă Horia. Literatura română vie, viaţa literară românească, a pierdut mult prin plecarea lui către alte orizonturi, unde a încercat, însă, să transplanteze stilul şi spiritul literaturii române, prin expresia propriei personalităţi. Aceste rememorări care ţin mai ales de sociologia literaturii, vor să facă vizibilă semnificaţia cazului Petru Popescu. Capitolul său literar, cărţile lui rămân şi marchează momentul literar în care au apărut. Petru Popescu aparţine literaturii române. Iar istoria vieţii lui literare poate fi privită cu o doză de regret. Este mereu cazul ca scriitorii de valoare să fie mai bine înţeleşi. Trebuie s-o facem cel puţin retroactiv. Tânărul "Zeu printre blocuri" face parte dintre ei.

20 III 1996 *MIHAI UNGHEANU*

Scanned with OKEN Scanner

Au apărut:

1. *Baltagul* - Mihail Sadoveanu
2. *Ciulinii Bărăganului • Codin* - Panait Istrati
3. *Romanul Comăneştenilor* - Duiliu Zamfirescu
4. *Geniu pustiu • Aur, mărire şi amor* - Mihai Eminescu
5. *Fraţii Jderi* - Mihail Sadoveanu
6. *Thalassa* - Al. Macedonski
7. *Groapa* - Eugen Barbu
8. *Ciocoii vechi şi noi* - Nicolae Filimon
9. *Manoil • Elena* - Dimitrie Bolintineanu
10. *Mara* - Ioan Slavici
11. *Zodia Cancerului sau Vremea Ducăi-Vodă* - Mihail Sadoveanu
12. *Europolis* - Jean Bart
13. *Papucii lui Mahmud* - Gala Galaction
14. *Maidanul cu dragoste* - G. M. Zamfirescu
15. *Zilele şi nopţile unui student întârziat* - Gib. I. Mihăescu
16. *Craii de Curtea Veche* - Mateiu Caragiale
17. *Sfârşit de veac în Bucureşti* - Ion Marin Sadoveanu
18. *Jocul cu moartea* - Zaharia Stancu
19. *Carlton* - Cezar Petrescu
20. *Ursita* - B. P. Hasdeu
21. *Dragomirna* - Victor Eftimiu
22. *Princepele* - Eugen Barbu
23. *Fecioarele despletite* - Hortensia Papadat-Bengescu
24. *Concert din muzică de Bach* - Hortensia Papadat-Bengescu
25. *Îngerul a strigat* - Fănuş Neagu
26. *Drumul ascuns* - Hortensia Papadat-Bengescu
27. *Ion* - Liviu Rebreanu
28. *Pădurea spânzuraţilor* - Liviu Rebreanu
29. *Adam şi Eva* - Liviu Rebreanu
30. *Mite • Bălăuca* - Eugen Lovinescu
31. *Inimi cicatrizate • Întâmplări în irealitatea imediată* - Max Blecher
32. *Adela* - Garabet Ibrăileanu
33. *Rusoaica* - Gib. I. Mihăescu
34. *O moarte care nu dovedeşte nimic • Ioana* - Anton Holban
35. *Ultima noapte de dragoste, întâia noapte de război* - Camil Petrescu
36. *Moromeţii (2 vol.)* - Marin Preda
37. *Întunecare* - Cezar Petrescu
38. *Zahei Orbul* - Vasile Voiculescu
39. *Enigma Otiliei* - G. Călinescu
40. *Tudor Ceaur Alcaz (2. vol.)* - Ionel Teodoreanu
41. *Moartea fratelui meu* - G. M. Vlădescu

Lector: Silvia Munteanu
Tiparul executat la "Polsib" S.A. Sibiu
ROMÂNIA

Scanned with OKEN Scanner